

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



TESIS DOCTORAL

**Papel de los receptores EphB2 y EphB3 en el desarrollo
tímico temprano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Montero Herradón

Directores

Agustín G. Zapata González

José Javier García-Ceca Hernández

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular



TESIS DOCTORAL

Papel de los receptores EphB2 y EphB3 en el desarrollo tímico temprano

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:

SARA MONTERO HERRADÓN

Directores

Agustín G. Zapata González

José Javier García-Ceca Hernández

2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular

Papel de los receptores EphB2 y EphB3 en el desarrollo tímico temprano

Sara Montero Herradón

D. Agustín G. Zapata González, Catedrático

y

D. José Javier García-Ceca Hernández, Profesor Titular Interino

Departamento de Biología Celular

Facultad de Biología

Universidad Complutense de Madrid

Certifican que Dña. Sara Montero Herradón, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, el trabajo titulado: “Papel de los receptores EphB2 y EphB3 en el desarrollo tímico temprano”, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Biología.

VºBº de los DIRECTORES

La interesada

Fdo.: Agustín G. Zapata

Fdo.: J. Javier García-Ceca


Fdo.: Sara Montero



AGRADECIMIENTOS

“la gratitud no es sólo la más grande de las
virtudes sino la madre de todas las demás”

Marco Tulio Cicerón



A Jorge,
a mis padres y a mi hermano.

“El ÉXITO en la vida
no se mide por lo que logras,
sino por los obstáculos
que SUPERAS”

Por fin llegó el día. El día de agradecer. Cuantas veces me he imaginado el momento de escribir estas palabras y cuanta emoción conlleva hacerlo. Ha sido un camino largo, con multitud de baches que me han servido para aprender a ser más fuerte y, sobre todo, para saber que la gente que me aprecia y me quiere siempre está conmigo. Por eso, os tengo mucho que agradecer, algunos más a nivel científico y otros a nivel personal, pero en definitiva, GRACIAS por haber hecho posible este trabajo.

Es obvio que mi primer agradecimiento tiene que ser para mi director, Agustín Zapata. Gracias por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis bajo tu dirección, y haberme enseñado tanto.

Y el segundo, para mis dos chicos: Javi-David, David-Javi. Creo que sobran las palabras y sólo puedo daros las GRACIAS, en mayúsculas, porque me habéis enseñado casi todo lo que sé y me dejáis una huella imborrable.

Javi, gracias por haber sido mi codirector. Porque a pesar de que te estrenabas como tal, y sabiendo que no era tarea fácil, no puedo estar más agradecida por todo lo que me has ayudado y me has aportado. Gracias por tu paciencia infinita, por tu trabajo organizado, por tus consejos y por tus ánimos en los momentos difíciles.

David eres único. Gracias por ser así, por sacar siempre lo positivo de las cosas, por ayudarnos a ver lo que el cansancio no nos permitía y, sobre todo, gracias por todas las risas que hemos compartido dentro y fuera del labo.

No me puedo olvidar de todos los que habéis pasado durante estos años por aquí. Por un lado, los brasileños: Eugenia, Desio y Viní. Y, por otro, a todos los chicos que vinieron a aprender y siempre me aportaron su granito de arena: Aída, Dayron, Fernando, los chicos de FP, Laura, y en especial a Bea, por su contribución directa en algunos resultados de esta Tesis; y a Luisito, por su compañía durante los últimos experimentos, por estar dispuesto a ayudarme en cualquier momento y por sus ocurrencias que tantas risas nos han causado.

Gracias a los dos laboratorios que me acogieron para llevar a cabo mis estancias, tanto al Dr Richard Boyd en Melbourne (Australia), como a la Dr Catherine Nobes en

Bristol (Reino Unido), pero muy especialmente al primero de ellos, por darme la posibilidad de estar en uno de los mejores grupos que trabaja en regeneración del sistema inmune, y más en concreto, en mecanismos de desarrollo y función tímica. Muy especial es mi agradecimiento a Ann Chidgey, porque no sólo fue mi supervisora durante aquellos 6 meses, sino que estuvo a mi lado desde el primer día hasta el último, preocupándose de cómo estaba y haciendo que mi estancia en Australia sea recordada como una gran experiencia, a pesar de todas las lágrimas derramadas.

Gracias a todos los que formáis o habéis formado parte del CAI de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, por haberme ayudado de una u otra manera a llevar a cabo este trabajo: Amalia, Luis, Alfonso, Carmen, Juanjo, Carlos, Tere, Esther, Paula, Miguel y, por supuesto, a tí Eva, porque fuiste un gran apoyo desde el primer momento. También a la gente de Medicina, a los que formáis parte del Anímalario, en especial a Juanpe por sus ánimos en esta última etapa. A Rosa y Jesús de Genómica y a Abel de Biomatemática, por su ayuda técnica en muchos aspectos que se nos escapaban de las manos.

Gracias a José Carlos Segovia y Rebeca Sánchez del CIEMAT, por su disposición y ayuda en este trabajo, a veces, tan complicado.

Hay dos personas a las que tengo mucho cariño y mucho que agradecer. GRACIAS ROSA Pérez Gomariz y YASMINA Juarranz porque me ayudasteis a la hora de empezar mi carrera científica, porque confiasteis en mí, e hicisteis posible tanto mi paso por el Hospital 12 de Octubre como por este Departamento. Gracias por todas las palabras de ánimo cuando no veía la luz al final del túnel y quería abandonar.

Gracias al Dr. Jose Luis de Pablos del Hospital 12 de Octubre, por darme la oportunidad de trabajar con él y con su grupo, e iniciarme así, en mi aventura científica. Gracias a María Galindo, Gabriel, Manu, María, Vane, Elena Izquierdo, Elena Gonzalo y Ali, porque nunca olvidaré como me acogisteis y todo lo que me enseñasteis.

GRACIAS a todo el DEPARTAMENTO de BIOLOGÍA CELULAR de esta Facultad, por hacer de este lugar como una casa. Seis años son muchos años, y muchos soís los que os habéis preocupado por mí, me habéis dado ánimos y ofrecido ayuda: Ketina, Íñigo, Maite, Elvira, Marta Torroba, Mar e Isabel, Agustín González y su grupo, los que estáís, Nerea, Jesús, Ruth, y los que no, Laura, Alberto y Sandra. Gracias.

Gracias Benjamín por ser como eres. He tenido durante este tiempo a una de las mejores personas, y sin ninguna duda al mejor profesor que he conocido en mi vida, animándome y enseñándome cada día algo nuevo, y eso no tiene precio.

Gracias Teresa por ser como una “mamí” en esta “casa”, por tu cariño, amabilidad y confianza.

Gracias a todas “las chicas” de Rosa Mari: Rosa, Yasmína, Irene, Mar, Rebe, Selene, Iria, Raúl y Javier Leceta, por las horas del café, las acogidas a la hora de comer, el nanodrop, el pH-metro, los WB, y por tantas cosas que hemos compartido, no sólo entre estas cuatro paredes.

GRACIAS a mis GRECAS, Selene y Sandra. ¡Cuántos momentos vividos! Lo mejor de estos años, sin duda, ha sido el tiempo compartido en el mismo cuarto, porque a pesar de los stresses y de los lloros, ha habido muchas risas. Selene, hay poco que te pueda decir porque has sido mi compañera de carrera, de máster, de casa, de Tesis y, por supuesto, una amiga, que será para siempre. Sandra, “compañera”, te conocí más tarde, pero hemos compartido infinidad de cosas, tanto dentro como fuera de “mordor”: las comidas con los chicos, multitud de cafés, de conversaciones que sólo eran interrumpidas por el timer, “investigaciones particulares” (tú ya me entiendes), en definitiva, gracias por el apoyo mutuo que nos hemos dado durante estos años y que espero, desde la distancia, seguir manteniendo.

Además, GRACIAS a todos mis BIOLOGUILLOS doctores y respectivos (Vir, Miguel, Félix, Sandra, Giaco, Lore, Alberto, Selene y Pízu). Fue genial haberos conocido durante la carrera y haberos mantenido después de este tiempo. Qué orgullosa estoy de todos vosotros, porque vais consiguiendo lo que os proponéis. Vir, eres mi chica talaverana, y jugabas con ventaja, gracias por compartir tanto

conmigo y darme terapia cuando más lo necesitaba. Miguel, el chico de la eterna sonrisa que conocí en primero. Te la jugué porque iba a hacer el BIR contigo y fíjate al final lo acabaste haciendo tú, y has sido residente y Doctor mucho antes que yo. Félix, nos unió "La encina", "La mosca" y las fiestas de pijamas. Siempre serás el chico que está dispuesto a darlo todo, incansable, al que no se le resiste nada. Giaco, el italiano que conocí de verdad gracias a Sandra, y que fue toda una sorpresa; atrevido y valiente por luchar por un sueño común. Lore, lo que me costó poder llamarte así, eres todo un ejemplo de perseverancia, trabajo y esfuerzo. Me encanta que compartamos lo que el destino ha puesto en nuestras vidas. Alberto y Pízu, vosotros también sabéis lo que es hacer una Tesis, por eso sois doctores consortes; gracias por haber aguantado a vuestras chicas y a mí. Además, gracias Pízu por considerarme uno de tus hobbits preferidos y haberme endulzado muchas tardes amargas. En fin, gracias por compartir "experiencias científicas" que sólo nosotros entendíamos, por haber estado siempre a mi lado, en momentos tan especiales, y espero que allí donde estéis nunca perdamos la amistad. Nos queda mucho camino que recorrer juntos.

Como no, GRACIAS a mis CHICAS y aunque no os pueda nombrar a todos, a mis AMIG@S, porque habéis hecho que no todo fuera Tesis, y que pequeños ratitos con cada uno de vosotros fuera una liberación. A partir de ahora, prometo devolveros todo ese tiempo que no os he podido dedicar.

Y, por supuesto, GRACIAS a mi FAMILIA, la biológica y la política. No me puedo olvidar de los que ya no están, porque el recuerdo de ellos forma parte de mi vida, y espero que hubiesen estado orgullosos de mí.

GRACIAS Jorge, Marí y Miriam, que habéis vivido tan de cerca toda esta etapa, y siempre habéis estado a mi lado, apoyándome en los malos, pero también en los buenos momentos.

GRACIAS a mi ABUELA, que ha luchado conmigo en cada etapa de mi vida, sufriendo por mí, y preguntándose si tanto esfuerzo merecía la pena. Hoy abu te

puedo decir que lo hemos logrado; como dice tu nombre, la ESPERANZA es lo último que se pierde. Nunca olvidaré todo lo que has hecho por mí.

No podría terminar sin una mención especial a ellos, a las personas que me dieron la vida. GRACIAS PAPIS por la educación que me habéis dado, por permitirme la posibilidad de irme a Madrid a estudiar la carrera que yo quería, cuando sé que todo hubiera sido mucho más fácil si hubiese estado en casa a vuestro lado. Gracias por apoyarme a la hora de tomar decisiones, que para mí no eran fáciles, y para vosotros tampoco, pero sabíais que eran lo mejor para mí. En definitiva, gracias por estar a mi lado y darme todo.

GRACIAS a mi hermano OSCAR, porque aunque él no sepa lo que es esto, desde que nació ha sido el motor de mi vida y sin él no habría podido hacer nada. Ojalá hubieses tenido la misma suerte que yo, pero a veces, la vida es injusta. Cambiaría todo para que tuvieras la misma oportunidad.

Y aunque eres la última persona, no eres la menos importante, yo diría la que más, porque empecé y acabé esta etapa junto a tí, gracias a tu insistencia. Porque durante estos años hemos sufrido y disfrutado juntos, pero ahora acabamos mucho más unidos de lo que empezamos. GRACIAS JORGE por aguantarme, por adaptarte a mí, por recorrer el mundo entero para darme ánimos cuando no podía más, por luchar más que yo, por tus consejos, por tus críticas, por un sinfín de cosas más, pero sobre todo, por ser la pareja perfecta. Esta Tesis es tan mía como tuya. ∞



ÍNDICE

ABREVIATURAS 1

INTRODUCCIÓN 7

1. EL TIMO, UN ÓRGANO LINFOIDE PRIMARIO ESENCIAL PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS T: ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA Y FUNCIÓN DE SUS COMPARTIMENTOS	9
2. DESARROLLO DEL PRIMORDIO TÍMICO	16
2.1. Organogénesis temprana: determinación a timo del endodermo faríngeo	17
2.2. Organogénesis tardía	19
2.3. Aparición y maduración fenotípica y funcional de las poblaciones epiteliales tímicas. Diferenciación Corteza/Médula	20
3. REGULADORES DE LA MADURACIÓN FUNCIONAL DEL EPITELIO TÍMICO	30
3.1. El papel de Foxn1	30
3.2. El papel de los timocitos	33
3.2.1. La organización de la red epitelial tridimensional (3D) del timo	34
3.2.2. La maduración funcional del epitelio tímico	37
4. MECANISMOS DE ORGANOGÉNESIS/HISTOGÉNESIS Y SU RELACIÓN CON LA DIFERENCIACIÓN DEL EPITELIO TÍMICO	41
5. EPH Y EPHRINA: NUEVOS REGULADORES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN TÍMICA	44
5.1. La familia de las Eph y las ephrinas	44
5.2. Papel de Eph y ephrinas en la biología del timo	49
5.2.1. Expresión	50
5.2.2. Celularidad tímica, Eph y ephrinas	52
5.2.3. Diferenciación T, Eph y ephrinas	56

5.2.4. Alteraciones en el epitelio tímico debidas a deficiencias en Eph y/o ephrinas	59
5.2.5. Relevancia de las interacciones timocitos-TECs mediadas por Eph/ephrinas para la funcionalidad tímica	60

OBJETIVOS 63

MATERIAL Y MÉTODOS 67

1. RATONES	69
1.1. Genotipado de los animales en estudio	70
1.1.1. Aislamiento ADN	70
1.1.2. PCR e identificación de los alelos WT y mutantes	71
2. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES, OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS	72
3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES	72
3.1. Suspensiones de lóbulos tímicos fetales de 12.5-17.5 días de desarrollo fetal	72
3.2. Suspensiones de hígado fetal procedentes de fetos de 12.5 días de desarrollo fetal	73
3.3. Suspensiones celulares enriquecidas en TECs procedentes de timos postnatales de 7 días o de lóbulos tímicos implantados bajo la cápsula renal	74
3.4. Enriquecimiento en células epiteliales <i>nurse</i> procedentes de timos adultos	75
4. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	76
4.1. Análisis fenotípico de las diferentes subpoblaciones celulares	76
4.2. Determinación de la viabilidad celular	78
4.3. Determinación de las células en proliferación	78
4.4. Análisis de la expresión de Eph y ephrinas	79
5. AISLAMIENTOS CELULARES	80
5.1. Aislamientos mediante <i>sorting</i>	80

5.2. Aislamiento de estroma tímico (CD45 ⁻) mediante selección magnética	81
6. CULTIVOS CELULARES	81
6.1. Enriquecimiento de fibroblastos murinos embrionarios	81
6.2. Cultivos tridimensionales (3D) de células epiteliales tímicas.....	82
6.3. Cultivos organotípicos de lóbulos tímicos fetales (FTOCs).....	84
6.4. Cultivos organotípicos de reagregados tímicos (RTOCs).....	85
7. TRASPLANTE DE LÓBULOS TÍMICOS FETALES ALINFOIDES DE 13.5F O RTOCs BAJO LA CÁPSULA RENAL.....	87
8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS CÉLULAS TÍMICAS	88
8.1. Aislamiento de ARN	88
8.2. Síntesis de ADNc mediante RT-PCR	88
8.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	88
9. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.....	89
9.1. Preparación de muestras para estudios histológicos.....	89
9.2. Estudio mediante inmunofluorescencia.....	90
9.3. Análisis cuantitativo sobre secciones histológicas o citocentrifugaciones (CTC)....	91
10. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE Eph MEDIANTE <i>Western Blot</i> (WB)	92
10.1. Preparación de muestras.....	92
10.2. Cuantificación proteica.....	94
10.3. <i>Western Blot</i> (WB)	94
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	96

ANEXO I	97
ANEXO II	101
ANEXO III	103
RESULTADOS	107
1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS TIMOS DEFICIENTES EN EPHB	109
1.1. Evolución de la celularidad tímica en ratones deficientes en EphB.....	109
1.2. Evolución de la población epitelial tímica inmadura EpCAM ⁺ CD45 ⁻ MTS20 ⁺	127
1.3. Evolución de las poblaciones epiteliales tímicas definidas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1	135
1.4. Análisis de las poblaciones Ly51 y UEA1 en base a la expresión de MTS20	149
1.5. Evolución del epitelio cortical	155
1.5.1. Poblaciones definidas por la expresión de CD205	155
1.5.2. Poblaciones definidas por la expresión de Ly51 y CD40.....	158
1.5.3. Poblaciones definidas por la expresión de Ly51 y MHCII	172
1.5.4. Poblaciones $\beta 5t^{+}$	186
1.6. Evolución del epitelio medular	190
1.6.1. Poblaciones definidas por la expresión de UEA1 y MHCII	190
1.6.2. Poblaciones definidas por la expresión de CD40 y CD80.....	199
1.6.3. Poblaciones definidas por la expresión de AIRE	203
1.6.4. La expansión medular al final del periodo embrionario	205
1.7. Progenitores epiteliales identificados mediante nuevos marcadores.....	210
1.7.1. Poblaciones definidas por la expresión de MTS20 y Cld3,4.....	210
1.7.2. Análisis de la población Cld3,4 ^{hi} SSEA1 ⁺	213
1.7.3. Análisis de las poblaciones de TECs definidas en base a la expresión de integrina- $\alpha 6$ y Sca-1	214

1.7.4. Análisis de la población Podoplanina ⁺	219
2. ORIGEN DE LOS DEFECTOS OBSERVADOS EN LOS TIMOS DEFICIENTES EN EPHB ...	222
2.1. Baja celularidad de los timos deficientes en EphB	222
2.1.1. Papel de las células linfoides.....	222
2.1.1.1. Alteraciones en las células progenitoras linfoides PIR ^{A/B+} y en timocitos DN	222
2.1.1.2. Producción de quimiocinas en el primordio tímico temprano WT y mutante	228
2.1.1.3. Muerte en la población linfoide en los primeros estadios del desarrollo tímico.....	236
2.1.1.4. Ciclo de la población linfoide durante el desarrollo tímico fetal	239
2.1.2. Papel de las células epiteliales tímicas.....	242
2.1.2.1. Muerte de las TECs en los primeros estadios del desarrollo tímico .	242
2.1.2.2. Ciclo de las TECs durante el desarrollo tímico fetal	244
2.1.2.3. TECs MTS20 ⁺ y MTS20 ⁻ en ciclo durante el desarrollo tímico fetal...	246
2.1.2.4. Ciclo de TECs definidas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 durante el desarrollo tímico fetal	252
2.2. Retraso en la maduración fenotípica del epitelio tímico en los timos deficientes en EphB.....	261
2.2.1. La alteración en la señalización Eph/ephrina-B afecta la celularidad tímica y la maduración de las células MTS20 ⁺	261
2.2.2. Potencial de diferenciación de los progenitores epiteliales inmaduros.....	263
2.2.2.1. Capacidad de maduración de FTOCs alinfoides derivados de timos deficientes en EphB injertados <i>in vivo</i> en huésped WT o mutante	264
2.2.2.2. Ensayos sobre la capacidad de maduración de subpoblaciones epiteliales concretas.....	271
2.2.3. Expresión de EphB2, EphB3, ephrina-B1 y ephrina-B2	280

2.2.4. Análisis de posibles cambios en la expresión de moléculas implicadas en la maduración del epitelio tímico en ratones deficientes en EphB	285
3. PAPEL DE LAS INTERACCIONES T-TEC EN LA MADURACIÓN EPITELIAL TÍMICA OBSERVADA EN TIMOS DEFICIENTES EN EPHB	290
3.1. La presencia de timocitos y las interacciones homotípicas entre células epiteliales afectan la maduración de las células MTS20 ⁺	290
3.2. Ensayos con células <i>nurse</i>	293
3.3. Cambios en la morfología de las TECs dificultan previsiblemente las interacciones T-TECs en timos deficientes en EphB.....	301
3.3.1. Alteraciones en la señalización EphB2 o EphB3 reproducen la morfología de las TECs mutantes	301
3.4. Alteraciones en la comunicación T-TEC mediada por EphB afectan el desarrollo del epitelio medular	305
3.4.1. Presencia de células V γ 5 ⁺ en timos deficientes en EphB	305
3.4.2. Papel de la vía RANKL.....	307

DISCUSIÓN 315

La implicación de Foxn1 en los fenotipos mutantes observados podría ser distinta durante el periodo fetal y en el timo adulto	318
La hipocelularidad de los timos deficientes en EphB afecta los timocitos pero también a las células epiteliales (TECs)	320
Alteraciones en la colonización linfoide del primordio tímico temprano afectan la celularidad linfoide de los timos deficientes en EphB.....	323
El descenso de la proliferación y el aumento de la apoptosis en los timocitos desde sus estadios más tempranos también contribuyen a la hipocelularidad tímica de los ratones deficientes en EphB	327
El retraso en la maduración epitelial temprana correlaciona con las alteraciones observadas en la diferenciación linfoide.....	333

Timos mutantes con celularidad reducida muestran mayor número de TECs apoptóticas a partir de 13.5F, pero no antes	337
Menor número de TECs en ciclo contribuye también a la hipocelularidad observada en el timo de ratones deficientes en EphB.....	339
El análisis fenotípico de las TECs a lo largo de la ontogenia tímica demuestra un retraso en la maduración de las poblaciones corticales y medulares de los timos mutantes que afecta también a la expresión de sus marcadores funcionales	348
<i>Retraso en la maduración de las poblaciones epiteliales corticales en ratones deficientes en EphB</i>	<i>351</i>
<i>Retraso en la maduración de las poblaciones epiteliales medulares en ratones deficientes en EphB</i>	<i>357</i>
<i>Diferenciación de progenitores epiteliales WT y mutantes definidos por la expresión de nuevos marcadores</i>	<i>362</i>
La falta de señalización mediada a través de EphB2 o EphB3 es responsable de las alteraciones fenotípicas observadas en los timos deficientes en EphB.....	365
Origen de los cambios observados en los timos deficientes en EphB que conducen a sus fenotipos característicos	372
<i>Papel de las interacciones timocitos-TEC en el fenotipo de los timos deficientes en EphB.....</i>	<i>372</i>
<i>Lo que los complejos nurse nos enseñan acerca del papel de Eph/ephrinas-B en las interacciones timocitos-TEC</i>	<i>375</i>
<i>Relevancia de la expresión de Eph y ephrinas-B en los primordios tímicos tempranos</i>	<i>376</i>
<i>Los cambios celulares que ocurren en el epitelio podrían modular las interacciones timocitos/TEC</i>	<i>379</i>
<i>La deficiencia en EphB podría cursar también con ausencia o reducción de las células linfoides implicadas en la maduración epitelial o de las señales moleculares implicadas</i>	<i>381</i>

La señalización mediada a través de EphB2, EphB2LacZ o EphB3 no afecta por igual el desarrollo de los distintos componentes tímicos.....	385
Ratones deficientes en EphB2, EphB3 y EphB2LacZ no muestran aparentemente signos de defectos inmunológicos.....	389
Futuras investigaciones	392
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>395</u>
<u>RESUMEN</u>	<u>401</u>
<u>SUMMARY</u>	<u>409</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>417</u>
<u>ANEXO IV (ARTÍCULOS PUBLICADOS)</u>	<u>463</u>



ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AIRE	<i>Autoimmune Regulator</i>
APCs	Células presentadoras de antígenos
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BCM	Borde córtico-medular
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cld3/4	Claudinas 3/4
CTC	Citocentrifugación
cTEC	Célula epitelial tímica cortical
DC	Célula dendrítica
Dll	<i>Delta Like</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Doble negativo (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP	Doble positivo (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
E	Estroma
eb1/2	ephrina-B1/-B2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
Eph	<i>Erythropoietin-producing hepatocyte kinases</i>
ephrina	<i>Eph receptor interaction protein</i>
F	días de desarrollo fetal o post-coito
FBS	Suero Bovino Fetal
Fezf2	<i>Forebrain embryonic zinc finger-like protein 2</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	Receptor del Factor de FGF
Fig.	Figura
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
Foxn1	<i>Forkhead box protein n1</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>

FTOC	Cultivo orgánico de lóbulos tímicos fetales
Gcm2	<i>Glial cells missing 2</i>
hi	Altos niveles de expresión
hIgG	Inmunoglobulina G humana
Hoxa3	<i>Homeobox 3</i>
HPRT-1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1</i>
HSB	<i>Hoechst Staining Buffer</i>
IL7	Interleucina 7
K	Queratina
KFG	Factor de crecimiento de queratinocitos
KO	<i>Knock Out</i>
Lin	Linaje
lo	Bajos niveles de expresión
LT	Linfotoxina
LTβR	Receptor de linfotoxina β
LTi	<i>Lymphoid Tissue Inducer Cells</i>
med	Niveles medios de expresión
MEF	Fibroblastos embrionarios murinos
min.	minutos
MHCI/II	Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I/II
mTEC	Célula epitelial tímica medular
MTS	<i>Mouse Thymic Stroma</i>
NIK	<i>NF-κB inducing kinase</i>
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NCC	Células mesenquimales derivadas de la cresta neural
ns	no significativo
Nude	<i>Athymic Nude Mice</i>
OPG	Osteoprotegerina
P	fosforilada
PanCK	Pancitoqueratina
Pax	<i>Paired box protein</i>
PBS	Tampón Salino Fosfato
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PDPN	Podoplanina
PIRA/B	<i>Paired immunoglobulin-like receptor</i>

PL	Progenitores linfoides
PM	Peso molecular
PN	Postnatal
r.p.m.	Revoluciones por minuto
Rag	<i>Recombination Activating gene</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-κ</i>
RE	Retículo Endoplasmático
ROTC	Cultivos organotípicos de reagregados tímicos
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SCID	Inmunodeficiencia Combinada Severa
SD	Desviación estándar
F	Señal <i>forward</i>
R	Señal <i>reverse</i>
Sin	<i>Src interacting protein</i>
Six	<i>Sine oculis homeobox</i>
SP	Simples positivas (CD4 o CD8)
SSC	<i>Side Scatter</i>
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TA	Temperatura Ambiente
TcR	Receptor de las Células T
TEC	Célula Epitelial Tímica
TEP	Progenitor epitelial tímico
tTEP	Progenitor epitelial tímico transitorio
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	Superfamilia de receptores del TNF
TRAF6	<i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>
TRAs	Antígenos restringidos de tejidos
Treg	Células T reguladoras
TSSP	<i>Thymus-specific serine protease</i>
Tyr	Tirosina
UEA1	<i>Ulex Europaeus Agglutinin-1</i>
vs	<i>versus</i>
WT	<i>Wild type</i>
2'-dGUO	2'-desoxiguanosina
7-AAD	7-Amino-Actinomicina-D



INTRODUCCIÓN

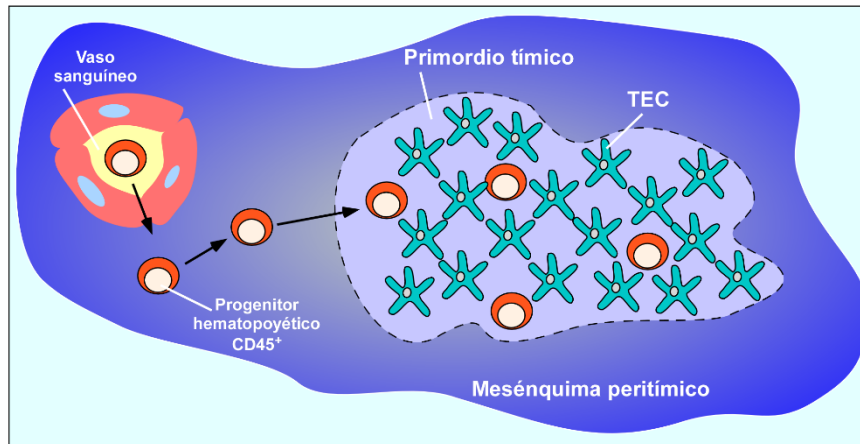
1. EL TIMO, UN ÓRGANO LINFOIDE PRIMARIO ESENCIAL PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS T: ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA Y FUNCIÓN DE SUS COMPARTIMENTOS

El timo es un órgano linfoide primario de origen epitelial encargado de la producción y el mantenimiento de los linfocitos T, tanto $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ (*Romano y cols., 2013*). Además, el órgano tiene capacidad para diferenciar otras líneas hematopoyéticas, como células dendríticas (DCs) y células *natural killer* (NKs) (*Barcena y cols., 1994; Sanchez y cols., 1994*). De hecho, los progenitores linfoides tras colonizar el timo pierden gradualmente su pluripotencia hasta comprometerse con el linaje T (*Rothenberg y cols., 2008*) generando células T funcionalmente maduras. El proceso implica la generación de un repertorio de receptores antigénicos (TcR) mediante recombinación y modificación de los genes de las cadenas β y α de los receptores. Al final de la diferenciación cada timocito expresa un único TcR específico y distinto del resto (*Thomas y cols., 2009*). Antes de su salida del timo, sus TcR, generados al azar, son seleccionados positiva y negativamente para asegurar que reconozcan y respondan exclusivamente a los antígenos no propios presentados en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) propio, pero no a los propios (**Esquema 1**).

Esta capacidad del timo para albergar y diferenciar progenitores linfoides a células inmunocompetentes depende de su estroma, particularmente de su componente epitelial cuya tridimensionalización es la base del *crosstalk* que se establece entre epitelio y timocitos en desarrollo. Ésta es una característica única de la diferenciación de los linfocitos T que no requieren otras células linfoides (*Dorshkind, 1990*). La tridimensionalización epitelial maximiza las interacciones linfo-estromales algo clave para la diferenciación de los timocitos y la maduración del epitelio, que ocurre en paralelo. El órgano está, de hecho, compartimentalizado en dos áreas histológicamente muy distintas denominadas corteza y médula con una zona de transición entre ambas, el borde o límite córtico-medular (BCM) (**Esquema 1**).

En el timo adulto los progenitores linfoides provenientes de la médula ósea alcanzan el órgano por los vasos del borde córtico-medular (**Esquema 1**), mientras que durante el período embrionario llegan al primordio avascular a través del mesénquima

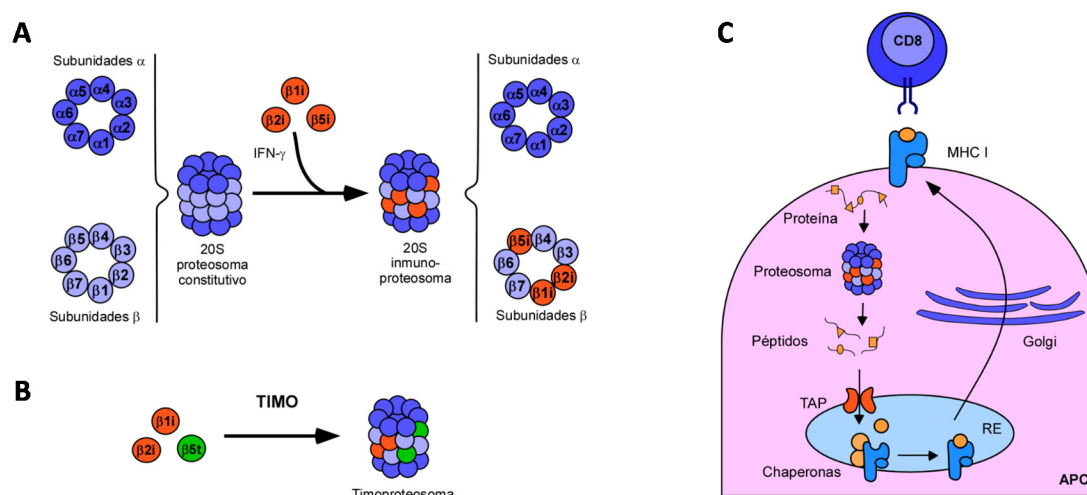
Por otro lado, las primeras poblaciones linfoides corresponden a las denominadas células dobles negativas (DN: CD4⁻CD8⁻) que se subdividen en cuatro subpoblaciones atendiendo a la expresión de los marcadores CD44 y CD25 (Godfrey y cols., 1993): CD44⁺CD25⁻ (DN1), CD44⁺CD25⁺ (DN2), CD44⁻CD25⁺ (DN3) y CD44⁻CD25⁻ (DN4). Además, las células DN1-2 expresan el receptor del *stem-cell factor* (SCF) y c-kit (CD117), que desaparecerá en las células DN3 y DN4 (Godfrey y cols., 1993; Douagi y cols., 2002). En el periodo adulto, la maduración de estas subpoblaciones acontece en la corteza del órgano donde las células DN1, que todavía son capaces de producir células NK y DCs, además de Ts, migran como células DN2 desde el borde córtico-medular hacia la zona subcapsular (Lind y cols., 2001; Porritt y cols., 2003) con el concurso de quimiocinas y sus receptores, CXCR4, CCR7 y CCR9 (Benz y cols., 2004) (**Esquema 1**). Recientemente, se ha demostrado que la maduración de los timocitos DN1 c-kit⁺ depende de mKitL, una molécula de membrana expresada por una población de células del endotelio vascular (VECs) de la corteza. Esta misma molécula expresada en cTECs también afecta al compartimento DN2 (Buono y cols., 2016), donde se regula positivamente la expresión de Rag (Wilson y cols., 1992), reordenándose los loci TcR δ y TcR γ , y se pierde la capacidad de producir células de otros linajes en la transición DN2a-DN2b. La llegada de las células DN a la corteza externa coincide con el estadio DN3 y las reordenaciones V(D)J en el locus TcR β ; aquellas que lo hacen adecuadamente se unen a una cadena α subrogada llamada pre-T α constituyendo el complejo pre-TcR (**Esquema 1**). La formación del pre-TcR junto con IL7 (*interleukin-7*), producida por el epitelio, y el ligando de Notch, Delta-like 4 (Dll4) contribuyen a la migración y proliferación de las subpoblaciones DN (Hozumi y cols., 2008; Koch y cols., 2008; Thompson y Zuniga-Pflucker, 2011; Hirano y cols., 2015) y, por otro lado, la interacción Dll4-Notch induce la expresión de CD4 y CD8 y el inicio de las reordenaciones en el locus TcR α .



Esquema 2. Esquema de la colonización del primordio tímico fetal avascular por los progenitores linfoides hematopoyéticos a 12F. La primera oleada de progenitores hematopoyéticos $CD45^+$ procedente del hígado fetal llega al primordio tímico por los vasos sanguíneos próximos a éste, abandonándolos para migrar a través del mesénquima peritímica y colonizar, a continuación, el primordio. *Adaptado de Jenkinson y cols., 2006.*

Tras la regulación de las primeras poblaciones de timocitos por Notch/Dll4 e IL7, las señales mediadas por el receptor antigénico pasan a ser fundamentales. En la corteza, se produce la selección positiva de los timocitos DP que han formado un $TcR\alpha\beta$. Los TcR de avidéz intermedia por los complejos péptido-MHC reciben señales de rescate que les permiten diferenciar a células SP, $CD4^+CD8^-$ y $CD4^-CD8^+$, que sufrirán un nuevo control, la selección negativa, esta vez en la médula (**Esquema 1**). Allí, las células que hayan sido seleccionadas positivamente pero que reconozcan antígenos propios con afinidad/avidéz alta recibirán señales apoptóticas desde el epitelio y las DCs que las eliminarán (Aliahmad y Kaye, 2006; Siggs y cols., 2006). Solamente las células epiteliales tímicas (TEC) corticales (cTEC) expresan una forma de proteosoma con una subunidad catalítica $\beta 5t$ ($\beta 5$ -thymus), distinta de las “clásicas” $\beta 5i$ expresadas en los inmunoproteosomas de las células estimuladas con IFN γ y las células presentadoras de antígenos (APC) “profesionales” (Murata y cols., 2007), que muestra una actividad peptidasa produciendo péptidos propios de alta afinidad por las moléculas MHC I (Ripen y cols., 2011; Sasaki y cols., 2015). La relación entre $\beta 5t$ y selección positiva se evidenció en ratones en los que falta la molécula, lo que conllevaba un significativo descenso de la proporción de células $CD8^+$, pero no de $CD4^+$, y el pequeño porcentaje de células $CD8^+$ que son seleccionadas positivamente muestran alteraciones en sus respuestas a distintos estímulos (Murata y cols., 2007; Nitta y cols., 2010) (**Esquema 3**). En el caso de la selección positiva de timocitos $CD4^+$ también intervienen cTEC que,

a diferencia de las células presentadoras profesionales, presentan antígenos sintetizados por la misma célula y procesados por autofagia, en vez de por fagocitosis (Nedjic y cols., 2008), utilizando para ello, además de las consabidas moléculas de MHCII, un juego único de enzimas lisosomales, TSSP (*thymus-specific serine protease*, gen Prss16) y cathepsina L, a diferencia de las TECs medulares (mTEC) y las DCs que expresan cathepsina S (Gommeaux y cols., 2009; Viret y cols., 2011) (**Esquema 4A**). TSSP y cathepsina L producen de forma no solapante autopéptidos procesados en MHCII que sólo ocurre en cTECs participando en la selección positiva de las células CD4⁺ (Takada y cols., 2014). No sabemos, sin embargo, el fenotipo concreto de las cTECs implicadas en la selección positiva. Tampoco en la corteza profunda, ni en la externa, se han identificado poblaciones epiteliales específicas implicadas en el mantenimiento de las células DN.



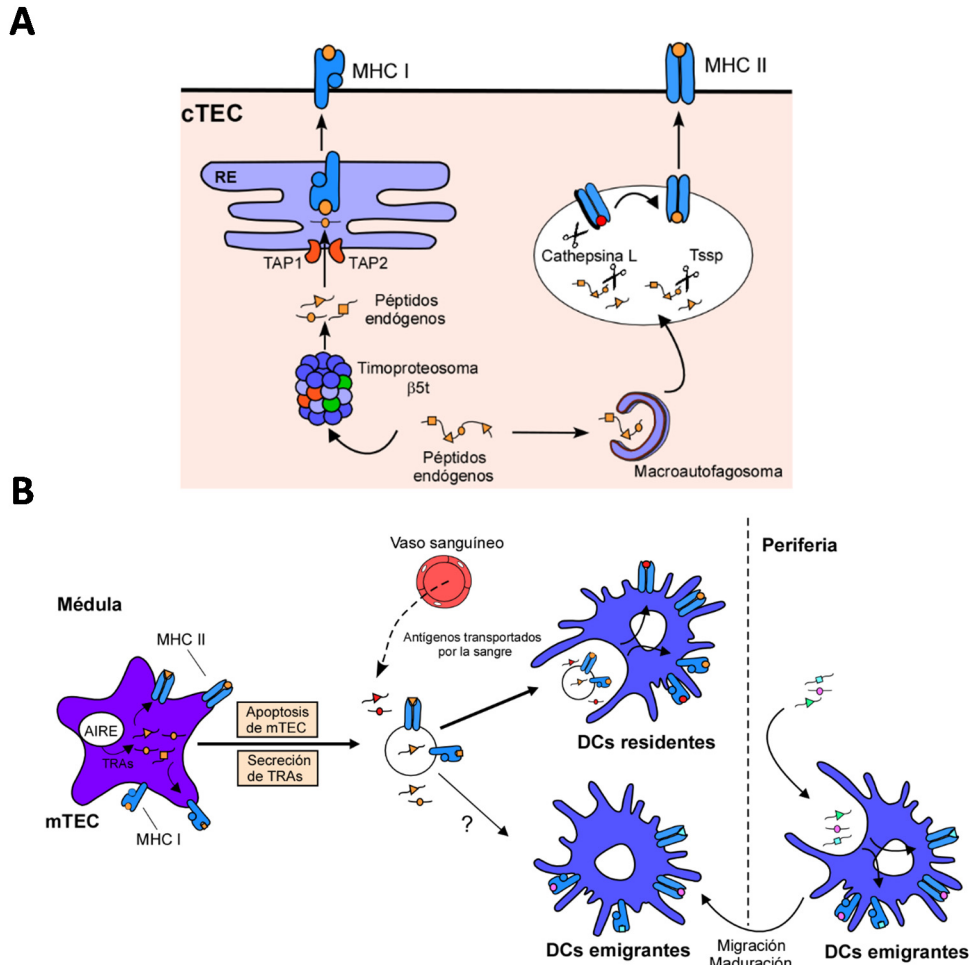
Esquema 3. Formación del inmunoproteosoma y del timoproteosoma. (A) El inmunoproteosoma está formado por un proteosoma 20S constitutivo y tres subunidades β denominadas “inmuno-subunidades” sintetizadas en respuesta al IFN-γ. **(B)** En el timo, las cTECs expresan el timoproteosoma, donde la inmuno-subunidad β5i del inmunoproteosoma es reemplazada por la subunidad β5t. **(C)** Esquema de la presentación de péptidos endógenos generados en el proteosoma, asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC I) en el retículo endoplásmico (RE) y presentados en la superficie celular a linfocitos T CD8⁺ a donde llegan a través del aparato de Golgi. APC, célula presentadora de antígenos. Adaptado de McCarthy y Weinberg, 2015.

Por otro lado, las interacciones péptidos-MHC-TcRαβ que seleccionan positivamente los timocitos CD4⁺ y CD8⁺ disparan también la expresión de CCR7, lo que permite que los timocitos DP seleccionados en diferenciación a SP migren a la médula desde la corteza interna atraídos por sus ligandos, CCL19 y CCL21 expresados por las mTECs

(Ueno y cols., 2004; Nitta y cols., 2009). En la médula, los timocitos sufren un nuevo proceso de selección para generar el repertorio T definitivo. mTECs y DCs medulares gobiernan la generación de esta tolerancia inmunológica central; las mTECs expresan múltiples antígenos restringidos de tejidos (TRAs) con el concurso del factor de transcripción AIRE, un regulador de la autoinmunidad (Derbinski y cols., 2001; Mathis y Benoist, 2009). Los TRAs son presentados en el contexto del MHC de clase II a los timocitos directamente, o indirectamente con el concurso de DCs (Hubert y cols., 2011) **(Esquema 4B)**. Aquellas células T que reconozcan antígenos propios con alta afinidad son eliminadas.

El proceso no se conoce, sin embargo en detalle y, por ejemplo, sólo un pequeño número de mTECs expresa un *set* de TRAs dado (Palmer, 2003; Derbinski y cols., 2008) por lo que, posiblemente, los timocitos deban moverse 4-5 días por la médula para ser capaces de interaccionar con todos ellos (McCaughy y cols., 2007). También DCs atraídas a la médula por linfotactina (XCL1), una molécula dependiente de AIRE, participan en la selección negativa; sin embargo, como no expresan AIRE no generan TRAs y los deben de obtener por fagocitosis de mTECs apoptóticas (Klein, 2009; Koble y Kyewski, 2009) **(Esquema 4B)**. Además, las mTECs expresan mucho más frecuentemente otros TRAs independientes de AIRE (Smith y cols., 1997; Anderson y cols., 2002; Derbinski y cols., 2005).

Recientemente, se ha descrito otro factor de transcripción Fezf2 (*forebrain embryonic zinc finger-like protein 2*), relacionado con la vía de señalización del LT β R, cuya falta también cursa con autoinmunidad y está implicado en la regulación de algunos de estos TRAs (Takaba y cols., 2015). Hay controversia respecto de si estos antígenos aparecen durante la diferenciación terminal de las mTECs (Derbinski y cols., 2005), o por el contrario, son ya expresados en células más inmaduras (Dooley y cols., 2009). Incluso se ha especulado que algunos TRAs podrían ser una consecuencia de la transcripción de genes “irrelevantes” durante la diferenciación epitelial (Gillard y Farr, 2005; Gillard y cols., 2007; Dooley y cols., 2008; 2009).



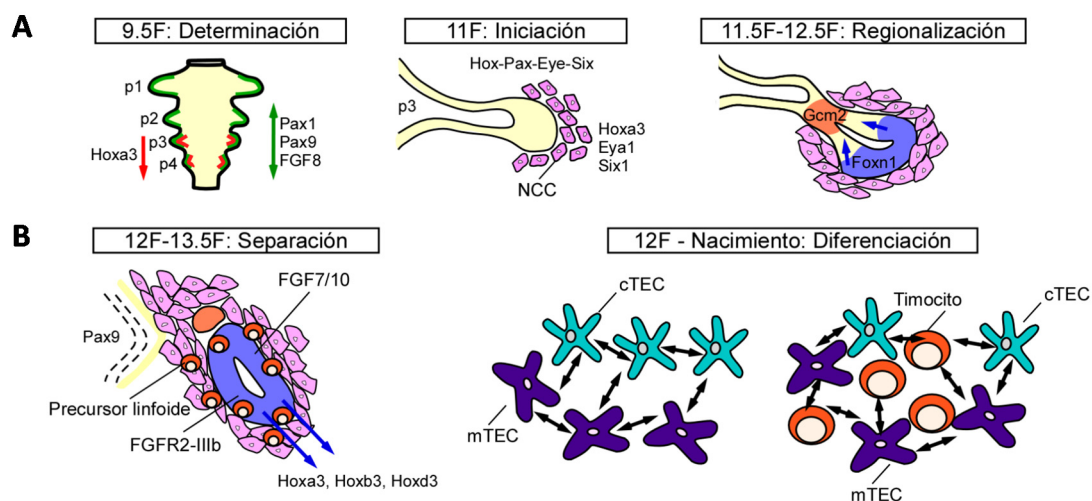
Esquema 4. Presentación antigénica en la corteza tímica para la selección positiva e inducción de la tolerancia inmunológica en la médula. (A) cTECs presentan antígenos en el contexto de MHC I o MHC II para seleccionar positivamente los timocitos en desarrollo. En el caso de MHC I interviene el timoproteosoma; y, en el de MHC II, enzimas lisosomales especiales, como Cathepsina L y TSSP. **(B)** En la médula, mTECs seleccionan negativamente timocitos con Tcr de alta afinidad. Estas células presentan antígenos restringidos de tejido (TRAs), inducidos por el gen AIRE, tanto en el contexto de MHC I como de MHC II. Los TRAs de las mTECs pueden ser también secretados y presentados a las células dendríticas (DCs) de la médula tímica que también intervienen en la inducción de la tolerancia inmunológica. Además, los fragmentos peptídicos generados durante la apoptosis de mTECs terminales y antígenos transportados por la sangre pueden ser captados por las DCs residentes para presentarlos y seleccionar nuevos Tcr. Por otro lado, DCs extratímicas que captan antígenos en la periferia pueden migrar al timo, donde maduran, contribuyendo también a la tolerancia central. *Adaptado de Klein y cols., 2009.*

DCs y mTECs también contribuyen dentro del timo a la generación de células T reguladoras (Treg, $CD4^+Foxp3^+$) (Roman y cols., 2010; Klein y Jovanovic, 2011; Lei y cols., 2011) que actúan en periferia suprimiendo los linfocitos T auto-reactivos que han podido escapar a la tolerancia central tímica. No obstante, no sabemos con certeza cuales son los mecanismos que determinan esta diferenciación, ni como el epitelio medular determina que timocitos han de diferenciar a Treg y cuales deben ser eliminados durante la selección negativa. Finalmente, células B presentes en la médula

tímica también participan en la inducción de tolerancia T presentando antígenos propios y contribuyendo a la generación de células Treg (Perera y cols., 2013; Walters y cols., 2014).

2. DESARROLLO DEL PRIMORDIO TÍMICO

El timo deriva del endodermo de los arcos faríngeos que se evaginan para contactar con el ectodermo de las hendiduras faríngeas y formar las bolsas faríngeas. En la zona de contacto, las células ectodérmicas sufren apoptosis no contribuyendo, finalmente, al estroma tímico (Rodewald y cols., 2001; Gordon y cols., 2004; 2005). En el ratón, la tercera bolsa faríngea dará el paratiroides y el primordio tímico alinfoide (Grevellec y Tucker, 2010).



Esquema 5. Organogénesis tímica temprana y tardía. (A) A 9.5F, durante la organogénesis temprana, el endodermo de la tercera bolsa faríngea determina un primordio común a partir del cual se originarán el timo y el paratiroides. A 11F, el primordio común crece mediante la activación de diferentes factores de transcripción y por la acción del mesénquima derivado de las células de la cresta neural (NCC). Entre 11.5F y 12.5F, el esbozo timo-paratiroides se regionaliza consecuencia de la expresión diferencial de los factores de transcripción Foxn1 y Gcm2, respectivamente. (B) En la organogénesis tardía, entre 12F y 13.5F, inicialmente el complejo timo-paratiroides se separa de la faringe, y después, se individualiza en dos órganos. Durante estas etapas llegan los primeros precursores linfoides y las poblaciones celulares tímicas (TEC y timocitos) comienzan su maduración. Adaptado de Blackburn y Manley, 2004.

Hoy se admiten dos etapas de maduración del primordio epitelial tímico; una organogénesis temprana, independiente de la expresión de Foxn1 (*Forkhead box n1*), un factor de transcripción imprescindible posteriormente, que resulta en la

evaginación del epitelio endodérmico de la tercera bolsa faríngea, y una organogénesis tardía, que organiza y diferencia el epitelio tímico (*Nehls y cols., 1996; Romano y cols., 2013; Vaidya y cols., 2016*). En la primera etapa, las interacciones epitelio-mesénquima dejan paso en la segunda a un papel fundamental de las interacciones entre el epitelio y los timocitos que son consideradas hoy en día junto con Foxn1, los principales reguladores del desarrollo tímico (*Rossi y cols., 2006*) (**Esquema 5**).

2.1. Organogénesis temprana: determinación a timo del endodermo faríngeo

En ratón, hacia 10.5F las células mesénquimales derivadas de la cresta neural determinan en el endodermo de la tercera bolsa faríngea el complejo timoparatiroides (*Manley y Blackburn, 2003; Gordon y cols., 2004*) con el concurso de numerosos genes como: Tbx1 (*T-box 1*) (*Jerome y Papaioannou, 2001; Lindsay, 2001; Arnold y cols., 2006*), Pax1 (*Paired box protein 1*), Pax3, Pax9 (*Dietrich y Gruss, 1995; Su y Manley, 2000; Hetzer-Egger y cols., 2002*), Hoxa3 (*Homeobox 3*) (*Manley y Capecchi, 1995*), Eya1 (*Eye absent homologue 1*) y Six1 (*Sine oculis homeobox 1*) (*Zou y cols., 2006*). En concreto, Pax1 y Pax9, junto con FGF8 (*fibroblast growth factor 8*), determinan la tercera bolsa faríngea a 9.5F, mientras la evaginación, crecimiento y regionalización del endodermo faríngeo, que ocurre a 11F, son dependientes de Hoxa3, Pax9, Eya1, Six1 y Noggin (**Esquema 5A**).

A 11.5F, cuando todavía el primordio está unido a la cavidad faríngea, la expresión de Gcm2 (*glial cells missing 2*) induce la diferenciación de la parte dorsal a paratiroides, mientras Foxn1 determina en la distal, el primordio tímico (*Blackburn y Manley, 2004; Gordon y Manley, 2011*), aunque el endodermo de la tercera bolsa faríngea ya está comprometido con el linaje TEC (*Vaidya y cols., 2016*) (**Esquema 5A**).

Junto con los factores de transcripción anteriormente indicados (*Wei y Condie, 2011*) varios morfógenos intervienen en la maduración del endodermo de la tercera bolsa faríngea a primordio tímico (*Balciunaite y cols., 2002; Bleul y Boehm, 2005; Rodewald, 2008*). BMPs (*bone morphogenetic protein*) expresadas en las células mesenquimales parecen inducir la expresión de Foxn1 a 11.25F (*Blackburn y Manley, 2004; Chidgey y Boyd, 2006; Patel y cols., 2006; Neves y cols., 2012*). En concreto, BMP4 determina tejido tímico y su antagonista Noggin, paratiroides (*Patel y cols., 2006*). En pez cebra, la ausencia de señalización a través de BMP4 resulta en un bloqueo severo del desarrollo

tímico, mientras Noggin parece suprimir la expresión de Foxn1 en la región especificada a paratiroides, pero su supresión no induce directamente expresión de Foxn1 (*Soza-Ried y cols., 2008*). La familia de los FGF parece colaborar con BMP4 en estos procesos. Así, la señalización a través de FGF parece necesaria para el inicio de la expresión de Gcm2, Foxn1 y BMP4 en el endodermo de la tercera bolsa, en la muerte celular que permite la separación del primordio de la faringe y, posteriormente, en el crecimiento del timo a partir de 12.5F mediado por FGF10 (*Gardiner y cols., 2012*).

Otro morfógeno, Shh (*Sonic hedgehog*) está implicado en la especificación del paratiroides y, en su ausencia, la mayoría del endodermo de la tercera bolsa faríngea se convierte en tejido tímico (*Moore-Scott y Manley, 2005*), y de nuevo, más tarde en la maduración de las TECs y en su desarrollo en el timo adulto (*Saldana y cols., 2016*). Por otro lado, Wnt (*wingless*) regula la expresión de Foxn1 (*Heinonen y cols., 2011a; 2011b*). Concretamente, Wnt4 y Wnt5b, producidos por TECs y timocitos, regulan la expresión de Foxn1 de forma auto- y paracrina a través de TCF-4 y LEF-1 (*Balciunaite y cols., 2002*). La sobre-expresión de Dkk1 (*Dickkopf-related protein 1*) en TECs, un inhibidor de Wnt4, produce atrofia tímica con reducción de progenitores y descenso de la proliferación de TECs (*Osada y cols., 2010*).

Tampoco se puede descartar la implicación de otras rutas alternativas independientes de Foxn1 en la maduración del epitelio tímico. Por ejemplo, se ha detectado actividad y expresión fetal de IL7 en ratones Foxn1^{-/-} (*Zamisch y cols., 2005*) y en estadios postnatales hay TECs Foxn1^{-/-} que expresan CCL25 y Dll4 (*Corbeaux y cols., 2010*).

Como antes se indicaba, las células derivadas de la cresta neural también participan en la organogénesis tímica (*Ge y Zhao, 2013*). Dichas células rodean el epitelio tímico y forman el mesénquima perivascular (*Le Douarin y Jotereau, 1975; Le Lievre y Le Douarin, 1975*), facilitando, presumiblemente, el establecimiento de los dominios específicos en el endodermo de la tercera bolsa faríngea. Las células derivadas de la cresta neural posiblemente también son cruciales para la separación del primordio del endodermo faríngeo porque en mutantes *Splotch* (*Pax3-null*), que no tienen tales células, no se produce o sucede con retraso (*Griffith y cols., 2009*). También se han descrito alteraciones en la migración del primordio tímico hacia la parte anterior de la cavidad torácica en ratones con una delección de ephrina-B2 condicionada a células de la cresta neural (*Foster y cols., 2010*).

Muchos de los efectos del mesénquima sobre las TECs, que acontecen después durante la organogénesis tardía, pero que adelantamos ahora, están mediados por moléculas de la familia FGF (*Sun y cols., 2013*) como sugiere el hecho de que la deficiencia en FGF8 (*Frank y cols., 2002*) en células derivadas de la cresta neural exhiben fenotipos similares (*Bockman y Kirby, 1984*). Por su parte, FGF7 y FGF10 producidos, principalmente, por fibroblastos y timocitos DN, inducen proliferación más que diferenciación de TECs (*Jenkinson y cols., 2003*). La adición de FGF7 a ratones Rag-/- produce expansión transitoria del epitelio (*Erickson y cols., 2002; Rossi y cols., 2007a; Berent-Maoz y cols., 2012*), mientras la pérdida de FGF10 inhibe el desarrollo del timo y altera el patrón de expresión de citoqueratinas (*Revest y cols., 2001*). Finalmente, ratones deficientes en FGFR2IIIb, receptor de FGF7 y FGF10, muestran un bloqueo en el desarrollo tímico a 12.5F. Además, Sin (*Src interacting protein*), una proteína adaptadora de la vía FGF7/FGFR2IIIb que se expresa en el epitelio medular, pero no en el cortical, inhibe la expansión del epitelio tímico en respuesta a FGF7 y activa p52 para promover supervivencia y diferenciación epitelial (*Alexandropoulos y Danzl, 2012*); su falta causa desorganización medular y descenso de la funcionalidad mTECs con el consiguiente desarrollo de autoinmunidad (*Sun y cols., 2013*).

2.2. Organogénesis tardía

A 12F, aumenta la expresión de Foxn1, se inicia la diferenciación del primordio epitelial tímico, el esbozo se separa de la cavidad faríngea, y timo y paratiroides se independizan (*Balciunaite y cols., 2002; Pongracz y cols., 2003; Blackburn y Manley, 2004*). A continuación, el epitelio se reorganiza, el lumen central se cierra con la participación de BMPs (*Gordon y cols., 2010*) y el primordio tímico es colonizado por los primeros precursores linfoides, organizándose una red tridimensional estromal (*Itoi y cols., 2001; Matsuda y Gapin, 2005*). El mesénquima circundante se internaliza en el esbozo, generando trabéculas conectivas. La llegada de las células linfoides y el aumento de la expresión de Foxn1 coinciden con el inicio de la diferenciación corteza/médula y la aparición de los primeros marcadores epiteliales. Desde entonces ambos componentes tímicos, epitelio y timocitos, evolucionan conjunta e interdependientemente (*van Ewijk y cols., 2000*) (**Esquema 5B**).

Foxn1 pertenece a una familia de factores de transcripción Fox implicados en numerosos procesos (*Kaufmann y Knochel, 1996; Schorpp y cols., 1997*). Tras el nacimiento sólo se expresa en timo y epidermis (*Brissette y cols., 1996; Mecklenburg y cols., 2005*), y en su ausencia, la colonización linfoide del timo falla (*Bleul y Boehm, 2000*) y la maduración del epitelio tímico aborta resultando en un timo alinfoide, cístico que provoca una severa inmunodeficiencia T tanto en humanos como en ratón (*Nehls y cols., 1996; Pignata y cols., 1996; Pignata, 2002; Su y cols., 2003*).

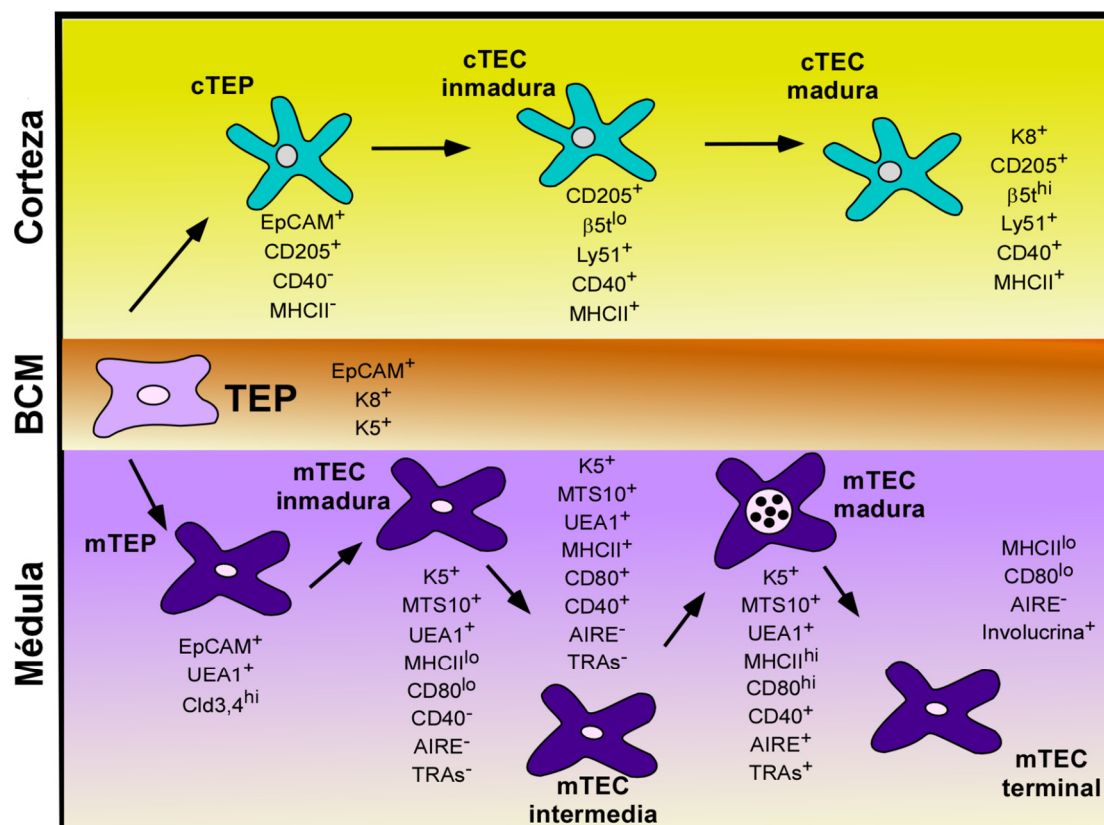
2.3. Aparición y maduración fenotípica y funcional de las poblaciones epiteliales tímicas. Diferenciación Corteza/Médula

En ratón, las cTECs han sido caracterizadas mediante la utilización de los marcadores: K8/K18, CDR1, Ly51 (CD249) (CDR1 y Ly51 identifican la misma subpoblación porque unen epítomos distintos del mismo antígeno) (*Gray y cols., 2002*), CD205 (DEC205) (*Shakib y cols., 2009*), $\beta 5t$ (*Ripen y cols., 2011*) y ER-TR4. Las mTECs expresan K5/K14, MTS10, ER-TR5 y UEA1 (*Van Vliet y cols., 1984; Klug y cols., 1998; Gray y cols., 2002*) (**Esquema 6**).

Las células K8⁺ en el timo son estrelladas y ocupan la corteza y zona subcapsular con algunas células K8⁺K5⁻ globulares en la médula. Por el contrario, las células K5⁺ se localizan principalmente en la médula y el área córtico-medular aunque algunas aparecen también en la corteza y área subcapsular (*Klug y cols., 1998*). Durante el desarrollo embrionario, el timo expresa ambas keratinas (K8⁺K5⁺) desde 11-12F, para luego aparecer las células K8⁺K5⁻ y K8⁻K5⁺, lo que llevó a proponer que las células K8⁺K5⁺ podrían ser progenitores epiteliales (*Gill y cols., 2002; Klug y cols., 2002*) (**Esquema 6**). Diversos modelos murinos con bloqueos en la diferenciación T temprana (*Klug y cols., 1998*) o en la maduración del epitelio tímico (*Nehls y cols., 1996*) demostraron que en el timo se acumulaban TEC K8⁺K5⁺.

Por otro lado, en el timo, K8, como otros filamentos intermedios, no actúa como un mero elemento estructural si no que también interviene en el control de la supervivencia epitelial. Timos de ratones KO para K8 mantienen la estructura general del órgano con una corteza periférica y una médula central, pero contienen grandes áreas que han perdido la expresión de marcadores corticales como CD205, Ly51 y $\beta 5t$ como consecuencia de un aumento de la apoptosis epitelial. Por el contrario, la

pérdida de K8 cursa con un descenso del número de células K5⁺ y alteraciones en su forma pero no en la expresión de otros marcadores medulares como UEA1, TPA, CD80 y AIRE (Odaka y cols., 2013).



Esquema 6. Diferenciación de las células epiteliales tímicas corticales y medulares murinas. El esquema muestra la aparición y maduración de las TECs corticales y medulares en base a la expresión de diferentes marcadores, a partir de un progenitor epitelial tímico (TEP), siguiendo un modelo de desarrollo sincrónico. BCM, borde córtico-medular. *Adaptado de Alves y cols., 2009; Sun y cols., 2013.*

Hay, no obstante, muchas subpoblaciones epiteliales, tanto en corteza como en médula, cuyas relaciones entre sí son poco conocidas y menos aún su función. En el caso de la población cortical, los marcadores de los que conocemos su función en el timo serían: CCRL1 (Rode y Boehm, 2012), IL7 (Alves y cols., 2010), Dll4 (Fiorini y cols., 2008), CD205, MHCII (Shakib y cols., 2009) y $\beta 5t$ (Ripen y cols., 2011). CCRL1, (también llamado CCX-CKR1), es un receptor *scavenger* que interacciona con CCL19, CCL21 y CCL25 (Heinzel y cols., 2007) y se expresa en las cTEC más que en las mTEC, aunque, células CCRL1⁺ fetales son capaces de originar mTEC, y, durante el periodo postnatal las mTEC expresan bajos niveles de CCRL1 (Ohigashi y Takahama, 2014; Ribeiro y cols., 2014). IL7 y Dll4 se expresan prácticamente por todo el primordio tímico restringiéndose posteriormente al borde córtico-medular donde aparecen formando

un pequeño grupo de células con fenotipo cortical y medular. Ambas moléculas contribuyen a la supervivencia y desarrollo temprano de los timocitos (*Hozumi y cols., 2008; Koch y cols., 2008*). Aproximadamente el 80% de las cTECs Ly51⁺ del timo postnatal expresan Dll4 y $\beta 5t$, y la mayoría IL7 (*Takada y cols., 2014*). Además, se han descrito subpoblaciones definidas por la distinta expresión diferencial de CD205, MHCII, Dll4, IL7 (*Takada y cols., 2014*) y Ly51 (*Cejalvo y cols., 2013*) demostrando la heterogeneidad de la población cortical.

El proceso de diferenciación del epitelio cortical y medular durante la ontogenia no está tampoco claro, igual que la aparición y evolución de las distintas subpoblaciones de células epiteliales, basándose los modelos “más tradicionales” en la aparición secuencial de los distintos tipos celulares. Precursores epiteliales diferencian a cTEC y mTEC maduras a partir de un progenitor bipotente común presente en el timo embrionario (*Gill y cols., 2002; Bleul y cols., 2006; Rossi y cols., 2006; Rodewald, 2008*) y adulto (*Bleul y cols., 2006*) (**Esquema 6**), cuyo fenotipo es, sin embargo, desconocido. Todo el epitelio del timo a 12.5F reacciona con el anticuerpo MTS20 que reconoce el antígeno Plet-1 (*Placenta-expressed transcript-1*) (*Depreter y cols., 2008*), aunque realmente MTS20 no identifica todos los precursores epiteliales tempranos (*Anderson y cols., 2009*). Igual sucede cuando se utiliza el anticuerpo MTS24, equivalente a MTS20. Presumiblemente, MTS24 reconoce un marcador específico del endodermo faríngeo durante la organogénesis más temprana, expresándose a 12.5F en todas las células del primordio, pero desapareciendo luego gradualmente. A 15.5F, el potencial para generar epitelio tímico reside tanto en las células MTS24⁺ como en las MTS24⁻ (*Gill y cols., 2002*). En timo adulto se describieron hace algunos años células MTS24⁺ en la médula, de función desconocida (*Barthlott y cols., 2006*), y, recientemente se ha identificado una población (EpCAM⁺UEA1⁻Ly51⁺Plet-1⁺MHCII^{hi}) que representa alrededor del 0.5% de las TECs y parece albergar un progenitor bipotente capaz de generar tanto cTECs como mTECs (*Ulyanchenko y cols., 2016*).

Por otro lado, las células que expresan CD205 (DEC205), el primer marcador específico de corteza, junto con la subunidad $\beta 5t$, aparecen a 12.5F y maduran secuencialmente generando tres poblaciones: CD205⁺CD40⁻MHCII⁻, CD205⁺CD40⁺MHCII⁺ proliferativas y CD205⁺CD40⁺MHCII⁺ no proliferativas (*Shakib y cols., 2009*). CD205 es una lectina tipo C de la familia de los receptores de manosa que actúa como un receptor endocítico

que incorpora a la cTEC moléculas capaces de ser presentadas tanto en el contexto de MHCII como de MHCI (Bonifaz y cols., 2002), pero cuya ausencia no afecta ni el desarrollo ni la selección de los timocitos (Jenkinson y cols., 2012).

En la médula, las moléculas utilizadas para caracterizar las subpoblaciones epiteliales han sido: MHCII, CD40, CD80, AIRE y CCL21 (Gabler y cols., 2007; Rossi y cols., 2007b; Shakib y cols., 2009; Lkhagvasuren y cols., 2013) definiéndose tres poblaciones, todas ellas que expresan UEA1 (Sun y cols., 2014): MHCII^{lo}CD80^{lo}AIRE⁻ (mTEC inmaduras); MHCII^{hi}CD80^{hi}AIRE⁺ (mTEC maduras) y MHCII^{lo}CD80^{lo}AIRE⁻Involucrina⁺ (mTEC terminales) (Rossi y cols., 2007b; Nishikawa y cols., 2010; Wang y cols., 2012) (**Esquema 6**). No es seguro que estas tres poblaciones sean homogéneas y lo más probable es que, a su vez, incluyan más subpoblaciones (Alexandropoulos y Danzl, 2012). Así, por ejemplo Meis1 (*myeloid ecotropic viral integration site 1*) codifica un factor de transcripción de la subfamilia TALE (*three-amino-acid-loop extension*), que parece necesario para el mantenimiento del epitelio tímico postnatal y diferencia dos subpoblaciones de TECs: una que expresa débilmente el factor y corresponde a mTECs maduras CD40⁺MHCII⁺CD80/CD86⁺AIRE⁺ y otra Meis1^{hi} de precursores inmaduros que expresan fuertemente Hoxa3, Pax1, Pax9, Pbx1 y Eya1, y que trasplantadas *in vivo* proliferan y diferencian a mTECs maduras (Hirayama y cols., 2014). No está claro, sin embargo, si las aquí llamadas mTEC inmaduras son el primer escalón del linaje medular directamente emergido del progenitor bipotente o si existe algún compartimento celular intermedio (ver luego). Así, como hemos dicho, Claudinas 3 y 4 (Cld3,4) marcan una población epitelial temprana que se considera progenitora de las mTECs AIRE⁺ (Hamazaki y cols., 2007), pero, curiosamente, hay células Cld3,4⁺ en el primordio tímico a 13.5F de ratones Foxn1^{-/-} que no desarrollan médula (Nowell y cols., 2011).

Se han descrito dos modelos para explicar la maduración del linaje mTEC en relación con la expresión de AIRE. En uno, las células maduras MHCII^{hi}CD80/86^{hi}AIRE⁺ derivan de inmaduras MHCII^{lo}CD80/86^{lo}AIRE⁻ (Gray y cols., 2007) que regulan, al tiempo, la expresión de AIRE y de los TRAs (modelo de la diferenciación terminal) (Gabler y cols., 2007). En el modelo de la restricción progresiva, AIRE y TRAs se expresan ya en las mTEC inmaduras y su diferenciación es controlada por AIRE, eligiendo unas vías y silenciando otras (Gillard y Farr, 2005). Ambos modelos están apoyados experimentalmente. Así, la expresión del gen de la caseína en mTECs está ligada a la

diferenciación celular (*Derbinski y cols., 2008*); ratones deficientes en AIRE contienen mTECs que expresan moléculas AIRE truncadas (*Dooley y cols., 2008*) que podrían estar reflejando una condición pre-apoptótica de AIRE (*Gray y cols., 2007*) y las células AIRE⁺ derivan de células AIRE⁻Cld3,4⁺CD80⁺ (*Hamazaki y cols., 2007; Rossi y cols., 2007b*). Por el contrario, el fenotipo de los timos AIRE^{-/-} que muestran alteraciones en la médula y en la composición de las poblaciones mTECs y de los TRAs se explica mejor mediante el modelo de la restricción progresiva (*Ramsey y cols., 2002; Gillard y cols., 2007*).

Independientemente de cual sea el modelo de diferenciación de las mTECs, no está del todo resuelto cual es la condición real de las células AIRE⁺. Las mTECs MHCII^{hi}CD80^{hi}AIRE⁺ maduras fueron consideradas células postmitóticas que sufrían finalmente apoptosis (*Gray y cols., 2007*). Sin embargo, otros autores han apuntado que podrían seguir diferenciando hasta incorporarse a los corpúsculos de Hassall (*Wang y cols., 2012*), estructuras que expresan marcadores epidérmicos, como involucrina (*Hale y Markert, 2004*). Durante esta diferenciación las mTECs perderían AIRE, y con ello, la expresión de CD80, MHCII y TRAs (*Nishikawa y cols., 2010*). En este sentido hay que señalar que los ratones AIRE^{-/-} no tienen corpúsculos de Hassall y, que son estructuras que aparecen durante el desarrollo después que las mTECs AIRE⁺ (*Yano y cols., 2008*), que son las únicas células en el timo involucrina positivas (*White y cols., 2010*). Otra posibilidad, recientemente apuntada, sería que, al menos, algunas de estas células finales fueran TECs “subfuncionales” consecuencia de la downregulación de Foxn1 y MHCII (*O'Neill y cols., 2016*).

Así descritos estos datos avalarían un modelo de diferenciación sincrónica del epitelio cortical y del medular, donde un progenitor bipotente común daría lugar a progenitores comprometidos con uno u otro compartimento que aún no expresan marcadores funcionales específicos y que diferenciarán finalmente a células maduras (**Esquema 7A**). Recientemente, sin embargo, se empieza a dibujar la naturaleza de estos precursores comprometidos, y con ello han aparecido modelos alternativos del desarrollo epitelial tímico, aunque los resultados son aún fragmentarios. Hamazaki y colaboradores (*Hamazaki y cols., 2007*) identificaron los progenitores comprometidos de las mTECs AIRE⁺ como células Cld3,4^{hi}UEA1⁺ que aparecen a 13.5F como islotes clonales distribuidos por todo el órgano (*Rodewald y cols., 2001*) y que previamente a 10.5F, ocupan la parte apical del rudimento tímico biestratificado, y a 12.5F la parte

central de pequeños clusters MTS10⁺ distribuidos por todo el timo y donde a 13.5F expresan por primera vez UEA1 (*Hamazaki y cols., 2007*). Recientemente, dentro de las células Cld3,4⁺ se ha descrito una subpoblación SSEA1⁺, cuyo número y capacidad clonogénica disminuye tras el nacimiento (*Sekai y cols., 2014*), y cuya expresión es anterior a la de RANK (*Baik y cols., 2016*). Así, en la médula fetal, tras la generación de las células Cld3,4⁺SSEA1⁺ se induce la de RANK en las distintas subpoblaciones de progenitores mTEC, coincidiendo con la regulación positiva de MHCII y negativa de CD205 (*Baik y cols., 2016*). En timos de 15.5F se han descrito también células CD205⁻CD40⁺, que expresan genes específicos de mTECs (*Shakib y cols., 2009*), lo que hizo proponer a los autores que podría tratarse de un progenitor intermedio medular, aunque sin especificar si correspondía (o no) a un estadio directamente relacionado con el progenitor bipotente común. También a 12.5F, cuando ya se expresan CD205 y $\beta 5t$, se ha descrito un compartimento cortical intermedio entre los progenitores bipotentes y las cTEC maduras que, sin embargo, requiere mejor caracterización (*Shakib y cols., 2009*). Aunque sin caracterizarlo, Rode y Boehm (*Rode y Boehm, 2012*) también describieron un progenitor cortical inmaduro capaz de regenerar cTECs adultas. Recientemente, Wong y colaboradores (*Wong y cols., 2014*) purificaron distintas subpoblaciones epiteliales adultas y ensayaron su capacidad progenitora usando RTOC injertados *in vivo* o en cultivos 3D, identificando una población única integrina- $\alpha 6$ ⁺Sca-1⁺MHCII^{lo} que expresa genes de progenitores epiteliales y es capaz de generar cTEC y mTEC, incluidas células que expresan AIRE.

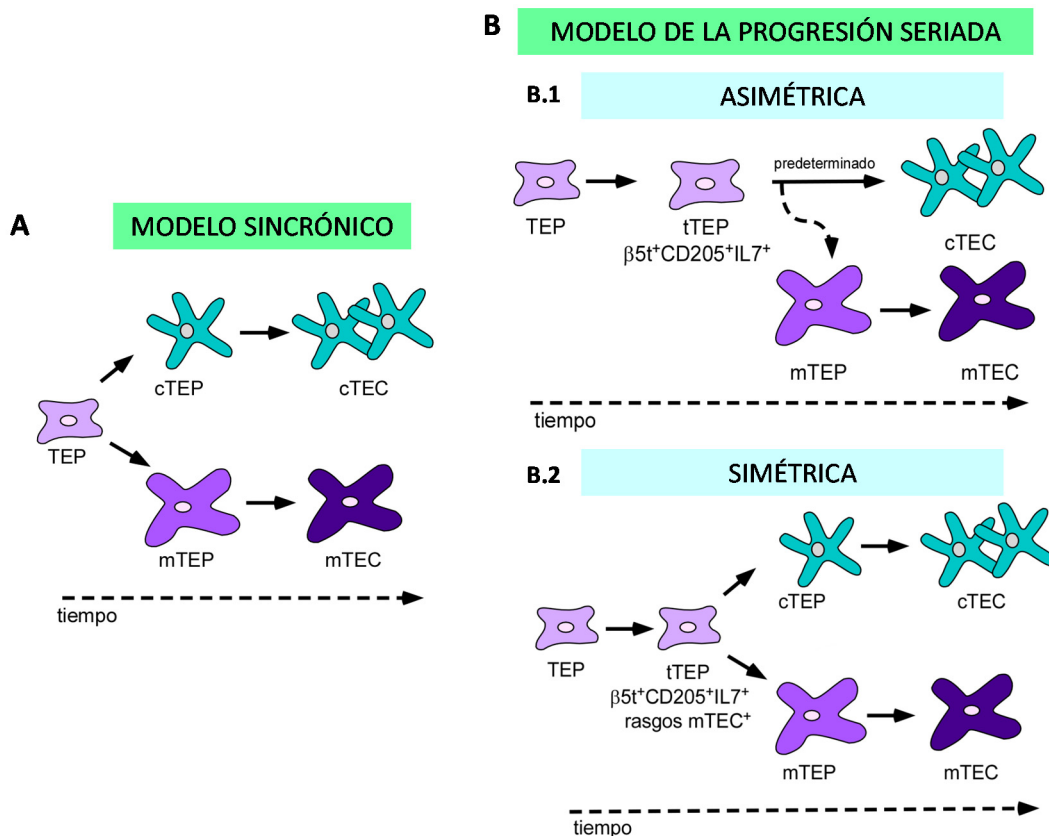
Estos resultados cuestionan, por tanto, el modelo de diferenciación sincrónica y sugieren la posibilidad de que el compartimento cortical anteceda en su diferenciación al medular sucediendo, por tanto, en distintos tiempos, de acuerdo a un modelo denominado de progresión seriada (*Alves y cols., 2014; Alves y Ribeiro, 2016; Ohigashi y cols., 2016*) (**Esquema 7B**). Por un lado, como hemos señalado, el primordio epitelial tímico expresa desde muy pronto marcadores típicos de cTECs, como CD205, $\beta 5t$, IL7 y DLL4 (*Fiorini y cols., 2008; Shakib y cols., 2009; Alves y cols., 2010; Ripen y cols., 2011*), que son capaces de dar *in vivo* células medulares. Así, RTOCs formados con células CD205⁺CD40⁻ que expresan marcadores corticales, trasplantados *in vivo* generan cTECs $\beta 5t$ ⁺CD205⁺ y mTECs AIRE⁺ (*Baik y cols., 2013*). Por otro lado, células CD205⁺ y CD205⁻

de timos de 12.5F son capaces de responder a RANK, un modulador de la diferenciación de mTECs (*Baik y cols., 2013*).

IL7, otro marcador temprano que se expresa en cTECs CD205⁺Ly51⁺ (*Ribeiro y cols., 2013*) y, en menor medida, en mTECs (*Alves y cols., 2009*) comienza a expresarse a 12.5F y entre 13F-14F la mayoría de TECs son IL7⁺, salvo una pequeña parte IL7⁻ que presenta características de mTEC, incluida la capacidad de responder a RANKL (*Ribeiro y cols., 2013*). En RTOCs, TECs IL7⁺ pueden dar lugar tanto a cTECs Ly51⁺CD205⁺ como a mTECs CD80⁺ y, por tanto, podrían ser una población intermedia con capacidad de compromiso cortical o medular. Por su parte, las IL7⁻ serían células capaces de dar exclusivamente linaje medular (*Ribeiro y cols., 2013*). Otros resultados van más allá confirmando la diferenciación directa de cTECs $\beta 5t^{+}$ a mTECs (*Ohigashi y cols., 2013*). Ohigashi y colaboradores demostraron que la mayoría de las mTEC (células K5⁺, Cld3,4^{hi}SSEA1⁺ y AIRE⁺) derivaban de progenitores epiteliales que han expresado $\beta 5t$ (*Ohigashi y cols., 2013; 2015*). Considerando que $\beta 5t$ no es detectable a 11.5F (*Ripen y cols., 2011*), su expresión en este estadio no debe estar restringida a un progenitor epitelial bipotente si no que aparece posteriormente, pero antes de la detección del progenitor epitelial comprometido con el linaje medular. En este sentido, es posible que las células epiteliales progenitoras bipotentes puedan coexpresar tanto genes asociados con el epitelio cortical, incluyendo $\beta 5t$, como genes típicos del epitelio medular (*Ohigashi y cols., 2013*). Además, en el timo adulto se ha descrito que la mayoría de las mTECs derivan de progenitores que han transcrito $\beta 5t$ durante la embriogénesis e incluso tras el nacimiento (*Ohigashi y cols., 2015; Alves y Ribeiro, 2016*).

Estos resultados toman en consideración la existencia de progenitores intermedios posteriores a los progenitores bipotentes comunes; además, puesto que la ausencia de $\beta 5t$ (*Murata y cols., 2007; Nitta y cols., 2010*), CD205 (*Jenkinson y cols., 2012*) o IL7 (*Alves y cols., 2014*) no afecta el desarrollo de las mTEC AIRE⁺, la expresión de los genes cTEC sólo deben estar reflejando estados intermedios más que estados directamente implicados en la divergencia al linaje mTECs. Alves y colaboradores (*Alves y cols., 2014*) han propuesto dentro de este modelo de progresión seriada, una progresión simétrica o asimétrica (**Esquema 7B**). Durante dicha progresión el progenitor bipotente daría lugar a un progenitor intermedio común con marcadores corticales y,

presumiblemente medulares, que diferenciaría simétricamente al linaje cortical y al medular (progresión simétrica) (**Esquema 7B, B.2**). Sin embargo, los resultados más recientemente publicados apoyan más bien una progresión asimétrica donde el progenitor bipotencial daría un progenitor intermedio con marcadores corticales que después se comprometería con el linaje medular. Las células que no lo hicieran formarían por defecto el compartimento cortical (**Esquema 7B, B.1**).



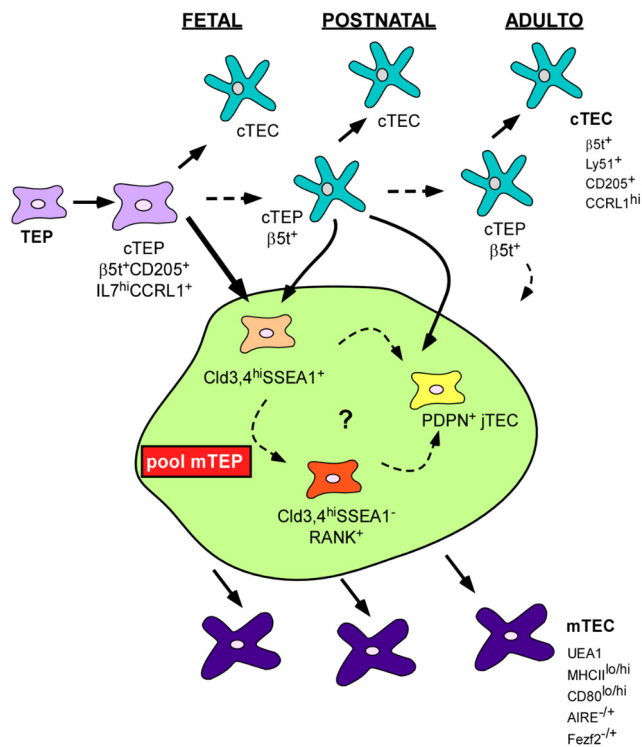
Esquema 7. Modelos propuestos para explicar el desarrollo de las diferentes subpoblaciones epiteliales tímicas.

(A) En el modelo sincrónico, un progenitor epitelial bipotente no comprometido (TEP) tiene capacidad de dividir y originar simultáneamente tanto células progenitoras comprometidas con el linaje cortical (cTEP) como con el medular (mTEP), que posteriormente madurarán hacia cTEC y mTEC, respectivamente. (B) En el modelo de la progresión seriada, el TEP atraviesa un estadio transitorio (tTEP) antes de comprometerse hacia el linaje cortical y medular. De este modelo se han propuesto dos variantes: *Asimétrica* (B.1), donde el tTEP está predeterminado hacia el linaje cortical (cTEC), pero tiene potencial de dar células progenitoras mTEP que darán lugar finalmente a mTEC maduras; y *Simétrica* (B.2), en cual a partir de un tTEP que expresa marcadores corticales y que, presumiblemente, expresaría también marcadores medulares no identificados, daría lugar tanto a células progenitoras del linaje cortical como del medular. *Adaptado de Alves y cols., 2014.*

Datos sobre el papel de CCRL1, cuyas características ya han sido descritas, apoyan este modelo de progresión seriada asimétrica. CCRL1 se expresa gradualmente durante la ontogenia contribuyendo a la expansión del compartimento cortical y del medular

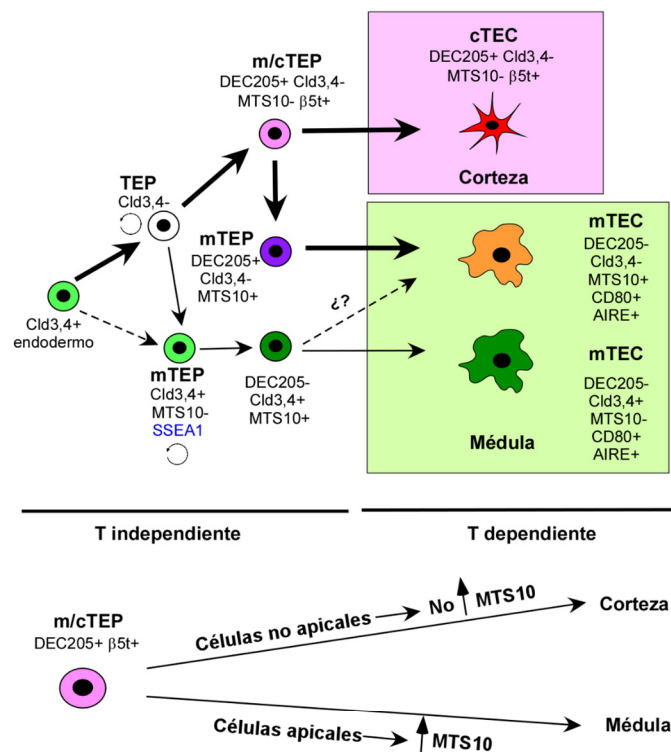
apoyando, por tanto, el modelo de progresión seriada asimétrica (*Ohigashi y Takahama, 2014; Ribeiro y cols., 2014*). Postnatalmente, se han identificado dos poblaciones CCRL1^{int}, UEA1⁺CD80⁻ y UEA1⁺CD80⁺; y RTOCs constituidos con células CCRL1⁺UEA1⁻CD80⁻ de timos de 15F estimulados con RANKL y CD40L generan mTECs CD80⁺. Estos resultados sugieren que las mTECs que expresan niveles intermedios de CCRL1 podrían derivar de un progenitor común que expresara marcadores corticales, de acuerdo, nuevamente, a un modelo de diferenciación de epitelio tímico seriado asimétrico (*Alves y cols., 2014*). Más recientemente, Onder y colaboradores (*Onder y cols., 2015*) han caracterizado otro progenitor adulto, CCL19⁺Podoplanina⁺, que se localiza en el BCM y que es capaz de generar directamente epitelio medular. Estos resultados hacen suponer que quizás en el área córtico-medular además de progenitores comprometidos con el compartimento medular los haya también con el cortical (*Anderson y Jenkinson, 2015*), y en general, que la separación de los dos compartimentos tímicos no es tan drástica como se pensaba o que, al menos, algunas subpoblaciones epiteliales tienen en algún momento de su vida características corticales y medulares.

Todos estos resultados han sido recientemente recogidos y ampliados de acuerdo a un modelo de progresión seriada asimétrica (*Alves y Ribeiro, 2016*). Durante el periodo fetal una población progenitora cortical (cTEP) $\beta 5t^{+}CD205^{+}IL7^{hi}CCRL1^{+}$ originaría células Cld3,4^{hi}SSEA1⁺ que diferenciarían a Cld3,4^{hi}SSEA1⁻RANK⁺ en el compartimento medular. Esta primera población Cld3,4^{hi}SSEA1⁺ se ha visto que podría surgir también a partir de cTEPs $\beta 5t^{+}$ postnatales que también tendrían capacidad para dar lugar a las células Podoplanina⁺ del borde córtico-medular (PDPN⁺ jTEC). Estas tres poblaciones epiteliales medulares Cld3,4^{hi}SSEA1⁺, Cld3,4^{hi}SSEA1⁻RANK⁺ y PDPN⁺ jTEC constituirían un *pool* de mTEP a partir del cual se desarrollarían, finalmente, las mTEC maduras. No sabemos, sin embargo, si estas células son etapas de un mismo programa de diferenciación o constituyen linajes medulares distintos (**Esquema 8**).



Esquema 8. Diferenciación de cTEC y mTEC de acuerdo a un modelo de progresión seriada asimétrica, que incorpora poblaciones progenitoras epiteliales recientemente descritas. Progenitores corticales $\beta 5t^+$ fetales (cTEP) determinan el linaje cortical y son capaces de dar cTEC pero también mTEC, aunque su potencialidad va disminuyendo a medida que avanza el desarrollo (parte superior). Además, los progenitores $\beta 5t^+$ (cTEP) son capaces de generar las poblaciones epiteliales medulares: $Cld3,4^{hi}SSEA1^+$ y $PDPN^+$, mientras los precursores $Cld3,4^{hi}SSEA1^-RANK^+$ provienen presumiblemente de la población $Cld3,4^{hi}SSEA1^+$. Adaptado de Alves y Ribeiro, 2016.

Aunque basándonos en otro tipo de resultados, nuestro grupo ha propuesto recientemente también un modelo asimétrico donde la diferenciación corteza/médula sería consecuencia del propio desarrollo histológico del timo y estaría determinado por su patrón de crecimiento, basado en un proceso de *branching*, morfogénesis y formación de lumen (ver luego), que sería posterior o concomitante a éstos (Munoz y cols., 2015; Tobajas, 2015) (**Esquema 9**). En este modelo, células $Cld3,4^+$ podrían diferenciar a mTEC pero también a cTEC.



Esquema 9. Modelo de diferenciación seriada asimétrica de los linajes medulares y corticales a partir de un progenitor bipotente común. Las células Cld3,4⁺ del endodermo pierden en gran medida la expresión de estas moléculas en progenitores intermedios, aunque algunas podrían mantenerla para dar mTEP. El progenitor bipotente Cld3,4⁻ (TEP) tendría capacidad, por tanto, para generar tanto el linaje cortical como el medular, regulando positivamente la expresión de Cld3,4 y diferenciando a epitelio medular (mTEP), o la expresión de DEC205 e iniciar la cortical (m/cTEP). Además, las células DEC205⁺Cld3,4⁻MTS10⁻ (m/cTEP) que ya han iniciado la diferenciación cortical, pueden dar, según la localización topológica en el epitelio y con el concurso de timocitos, finalmente corteza (cTEC), (posición no apical) o médula (posición apical). En este último caso, las células apicales regulan positivamente el marcador MTS10, y negativamente el DEC205, para en estadios posteriores y en presencia de progenitores linfoides, adquirir CD80 y AIRE (mTEC). Las líneas discontinuas indican posible ruta de diferenciación y las líneas gruesas indican las rutas de diferenciación prioritarias. *Adaptado de Tobajas, 2015 (Tesis doctoral).*

3. REGULADORES DE LA MADURACIÓN FUNCIONAL DEL EPITELIO TÍMICO

3.1. El papel de Foxn1

A pesar de la reconocida importancia de esta molécula para la determinación del primordio tímico, nuestro conocimiento sobre el papel de Foxn1 en la diferenciación epitelial tímica posterior y en el mantenimiento de las poblaciones epiteliales maduras tiene importantes lagunas. Foxn1 podría expresarse diferencialmente durante la determinación del linaje epitelial tímico de manera que en el timo fetal se expresase en todas las TECs, pero después del nacimiento no. Otros resultados, sin embargo, apoyan un papel central para Foxn1 en la homeostasis del timo adulto (*Corbeaux y cols., 2010*) y Blackburn y colaboradores (*Blackburn y cols., 1996*) demostraron que es

necesario para el desarrollo postnatal de todos los linajes epiteliales. También se ha descrito su expresión diferencial en cTECs y mTECs de forma que la pérdida de Foxn1 afectaría la maduración de las mTECs pero no la de las cTECs (Cheng y cols., 2010). En el mismo sentido, las TECs medulares postnatales serían más sensibles a Foxn1 que las corticales (Zhang y cols., 2012). Datos más recientes estudiando los timos de ratones que mostraban niveles distintos de Foxn1 por expresar un alelo hipomórfico (Nowell y cols., 2011), indican que Foxn1 no participaría en la determinación del compromiso del progenitor epitelial común, pero sí en la progresión de la diferenciación de las distintas subpoblaciones corticales y medulares fetales y postnatales, de manera que distintos niveles de expresión de Foxn1 regularían diferentes estadios de la diferenciación epitelial; bajos niveles serían suficientes para iniciar la diferenciación epitelial, pero hacen falta otros más altos para alcanzar la plena maduración funcional del epitelio y para mantener, posteriormente, la identidad de su linaje (Chen y cols., 2009; Nowell y cols., 2011).

Ratones Foxn1^{nu/nu} (*nude*) detienen definitivamente la diferenciación del epitelio tímico en 12F, sin adquirir marcadores corticales tempranos como CD205 y $\beta 5t$ (Shakib y cols., 2009), e impide la colonización de precursores linfoides (Cordier y Heremans, 1975). Foxn1 ^{Δ/Δ} son ratones transgénicos con un alelo Foxn1 hipomórfico al que le falta el exón 3 y, por tanto, la región amino terminal (Su y cols., 2003). El fenotipo sólo afecta al timo, no a la piel, y es menos severo que el de los ratones *nude*: contiene muchos quistes, no se puede identificar una corteza o una médula y, aunque los progenitores linfoides colonizan el timo, no se diferencian a timocitos. Los ratones Foxn1^{LacZ} tienen insertado el gen LacZ en el extremo 3' del gen Foxn1. En ellos, la expresión del factor de transcripción es normal después del nacimiento y entonces empieza a declinar por mecanismos desconocidos. Cuando la reducción alcanza el 50% se produce atrofia tímica con una reducción dosis dependiente de TECs y timocitos, siendo la población de mTECs MHCII^{hi}UEA1^{hi} madura la más sensible (Chen y cols., 2009). La delección ubicua de Foxn1 después del nacimiento (ratones Foxn1^{fx} (fx)) produce atrofia tímica severa en 5 días que, de nuevo, afecta particularmente a las TECs de fenotipo maduro que mueren por apoptosis (Cheng y cols., 2010) en un fenotipo similar al observado en ratones con delección condicionada de Foxn1 en células mTECs K5⁺. La delección espontánea de Foxn1 con la edad (ratones fx/fx-

nCreER^T) cursa con quistes medulares y alteraciones en la selección negativa, consecuencia de una reducción de la expresión de AIRE (*Xia y cols., 2012*). Finalmente, ratones transgénicos (Foxn1Tg) que sobreexpresan Foxn1 atenúan la involución tímica por envejecimiento aumentando el número de células epiteliales tímicas totales y de mTEC MHCII^{hi} (*Zook y cols., 2011*).

El envejecimiento tímico está relacionado con el descenso en la expresión de Foxn1 (*Ortman y cols., 2002; Sun y cols., 2010*) de manera que, su delección postnatal produce involución tímica (*Chen y cols., 2009; Cheng y cols., 2010*) y su sobre-expresión la retrasa aunque no la impide (*Sun y cols., 2010; Zook y cols., 2011*). Además, ADNc de Foxn1 inyectado en el timo de ratones viejos aumenta su tamaño y celularidad (*Sun y cols., 2010*). Recientemente, la sobreexpresión de Foxn1 se ha mostrado suficiente para regenerar un timo viejo (*Bredenkamp y cols., 2014*). Finalmente, Foxn1 no sólo participa en la diferenciación epitelial tímica si no que también promueve su proliferación y, junto con IL22, la regeneración tímica; *de facto* la eliminación selectiva de timocitos DP aumenta la expresión de Foxn1 e IL22 y dispara la regeneración epitelial (*Pan y cols., 2014*).

La pregunta es, por tanto, si Foxn1 es suficiente para desencadenar el programa de diferenciación epitelial tanto en el timo fetal como en el adulto. Algunos datos avalan esta posibilidad. Células aisladas de timos *nude* postnatales revierten el fenotipo generando pequeños organoides capaces de diferenciar corteza y médula y permitir la maduración T (*Bleul y cols., 2006*). Además, la sobreexpresión de Foxn1 reprograma fibroblastos y los capacita para formar un timo funcional, capaz de diferenciar células T, como antes indicábamos (*Bredenkamp y cols., 2014*).

Por el contrario, otros datos apuntan la existencia de rutas independientes de Foxn1, implicadas en la maduración funcional del epitelio tímico. Como decíamos, ratones Foxn1^{-/-} fetales expresan IL7 (*Zamisch y cols., 2005*) y los postnatales, CCL25 y Dll4 (*Itoi y cols., 2007*). Ucar y colaboradores han descrito recientemente progenitores bipotentes con características de células madre en timos adultos Foxn1^{-/-}, capaces de formar timoesferas que contienen células K8⁺ o K14⁺, lo que sugiere que Foxn1 no sería necesario ni para el mantenimiento de la población epitelial ni para la generación de células comprometidas con los linajes cortical o medular, aunque sí para la posterior diferenciación y supervivencia de dichos linajes (*Ucar y cols., 2014*). Más

difíciles de explicar son otros resultados que indican que células madre mesenquimales aisladas de cordón umbilical son capaces por sí solas, mediante las citocinas que secretan, de reestablecer la arquitectura tímica de ratones *Foxn1*^{-/-} promoviendo diferenciación epitelial, timopoyesis y colonización periférica de células T maduras (*Liu y cols., 2014*).

Tampoco está del todo claro, la relación y el papel que *Foxn1* juega con otros factores relevantes para el desarrollo pre- y postnatal tímico. *Foxn1* parece regular la expresión de CXCL12 y CCL25 (*Bleul y Boehm, 2000; Koch y cols., 2008; Bajoghli y cols., 2009*), implicada en la colonización del primordio tímico por progenitores linfoides; de Dll4 y Dll1, ligandos de Notch, implicados en la diferenciación temprana de los timocitos; de la subunidad $\beta 5t$ del timoproteosoma expresada en cTECs (*Ripen y cols., 2011*) y de otras moléculas funcionalmente importantes para el epitelio tímico, incluidas catepsina L, CD40 y moléculas de MHCII (*Nowell y cols., 2011*). Parece difícil, por el contrario, que *Foxn1* controle directamente la expresión de AIRE porque los timos *nude* contienen transcritos de AIRE (*Dooley y cols., 2005*) y datos recientes de nuestro grupo indican que no es capaz de inducir la expresión de los marcadores medulares funcionales CD80 o AIRE (*Tobajas, 2015*). *Foxn1* parece también responsable de la invasión desde la cápsula conectiva de las células endoteliales y del mesénquima perivascular que formarán los primeros vasos tímicos (*Mori y cols., 2010; Farley y cols., 2013*).

En el timo fetal, *Foxn1* induciría expresión de p63 para promover la proliferación de progenitores comunes, antes de su compromiso cortical o medular (*Senoo y cols., 2007*). En el timo adulto *Foxn1*, en colaboración con el factor de transcripción Trp63, homólogo de p63 e implicado en el desarrollo de distintos epitelios estratificados (*Candi y cols., 2007*), podría regular la homeostasis del epitelio tímico (*Romano y cols., 2013*). En este estadio, la expresión es más alta en cTECs que en mTECs, y en células MHCII^{hi} que en las MHCII^{lo} (*Vaidya y cols., 2016*).

3.2. El papel de los timocitos

Muchos resultados han apuntado el papel esencial jugado por los timocitos una vez que colonizan el timo en la diferenciación del epitelio tímico (*van Ewijk y cols., 2000*). Aunque la llegada de los primeros progenitores linfoides coincide con la diferenciación

de las células epiteliales $K5^+K8^+$ (Bennett y cols., 2002; Gill y cols., 2002), se ha sugerido que el verdadero *crosstalk* entre timocitos y TECs no sucede hasta 15.5F coincidiendo con la aparición de los timocitos DN3 lo que algunos interpretaron como que las interacciones timocitos-TECs no serían necesarias para la diferenciación inicial del epitelio, en especial, del cortical que acontece antes (Klug y cols., 2002; Shakib y cols., 2009).

En ratones hCD3 ϵ tg26, transgénicos para la cadena ϵ del CD3 humano, con un bloqueo temprano del desarrollo T, las cTECs de 15F no progresan más allá del estadio inmaduro CD205 $^+$ CD40 $^-$ MHCII $^-$, mientras en ratones Rag1 $^{-/-}$, donde se produce un bloqueo en el desarrollo T algo después, en el estadio DN3, las células alcanzan el estadio CD205 $^+$ CD40 $^+$ MHCII $^+$, sugiriendo que mientras la presencia sólo de células DN1 no permite la maduración del epitelio tímico, las células DN3 sí lo hacen (Shakib y cols., 2009). En apoyo de esta hipótesis, RTOCs establecidos con células tímicas de 16.5F injertados en ratones doblemente deficientes para Rag2 y MHCII organizan un timo normal (Rodewald y cols., 2001). Por su parte, la aparición de las regiones medulares acontece cuando lo hacen los timocitos SP correlacionando de nuevo la expansión medular con el aumento del porcentaje de SP (Gray y cols., 2006). No obstante, se han descrito ratones con bloqueo temprano de la maduración T que contienen células $K5^+K8^+$ o CD205 $^+$ CD40 $^+$ (Klug y cols., 2002; Shakib y cols., 2009) capaces de madurar incluso hasta mTEC AIRE $^+$ a pesar de la prolongada ausencia de timocitos (Roberts y cols., 2009). Quizás, el papel jugado en el proceso de maduración de las mTECs por las células inductoras linfoides (LTi) y los timocitos V γ 5 $^+$ durante el desarrollo embrionario (ver luego) y, más tarde, por los timocitos SP estaría vinculado a momentos muy puntuales y concretos del desarrollo tímico.

3.2.1. La organización de la red epitelial tridimensional (3D) del timo

En la mayoría de los órganos, las células epiteliales se disponen sobre una membrana basal formando una lámina plana de células orientadas. En el timo esta disposición sólo se mantiene en los estadios más tempranos; en el caso del ratón, con la llegada de los progenitores linfoides alrededor del día 11 comienza a organizarse una red esponjosa tridimensional (3D) (van Ewijk y cols., 1999), aunque quedan algunas

estructuras residuales apico-basales que mantienen la estructura 2D, denominadas quistes (Farr y cols., 2002; Dooley y cols., 2005; Vroegindeweij y cols., 2010).

La relevancia de las interacciones epitelio-timocitos para la organización de esta red 3D se ha puesto de manifiesto en varios modelos experimentales. Los primeros estudios demostraban que en el timo de ratones hCD3 ϵ tg26 con bloqueo de la diferenciación T, el epitelio tímico estaba profundamente alterado: las cTECs se disponen en paralelo no en perpendicular a la cápsula tímica y la estructura tridimensional medular desaparece dejando grandes quistes. El proceso revertía si se le suministraban al timo progenitores linfoides tempranos. En el mismo sentido, timos SCID (*severe combined immunodeficiency*), que presentan corteza pero no médula, porque sólo contienen timocitos DN tempranos, recuperan su estructura 3D si se les suministra linfocitos T maduros CD4 y CD8 (Shores y cols., 1991; van Ewijk y cols., 1994).

En los primeros estudios se apuntó que, además de los timocitos, otros factores como la presión parcial de O₂ podrían estar también implicados en la tridimensionalización. Así, lóbulos tímicos fetales cultivados a alta presión de O₂ se organizaban tridimensionalmente, mientras que a baja presión se bloqueaba el desarrollo de los timocitos, aparecían quistes y el epitelio se organizaba en 2D (van Ewijk y cols., 2000). También lóbulos tímicos tratados con 2'-dGuo perdían la organización 3D y no la recuperaban hasta que no recibían progenitores linfoides. FTOCs y RTOCs, que mantienen una estructura tridimensional, son capaces de permitir la diferenciación T, pero ni monocapas de TECs aisladas ni líneas celulares lo son (Montecino-Rodriguez y cols., 1996). En relación con estos resultados la expresión de ligandos de Notch, conocidos por ser capitales para el compromiso de los progenitores linfoides con el linaje T, explican estos resultados. En monocapas de TECs la expresión de Dll1 y Dll4 desaparece mientras los dos transcritos se mantienen en FTOCs y RTOCs; Jagged 1 se mantiene igual en los cultivos y Jagged 2 se regula negativamente también en monocapas. Por el contrario, monocapas transfectadas con Dll1 o Dll4 recuperan la capacidad para diferenciar linfocitos T. Parece, por tanto, que hay cierta correlación entre el establecimiento de una estructura 3D y el mantenimiento de la expresión de Dll, ambas condiciones necesarias para la maduración T (Mohtashami y Zuniga-Pflucker, 2006). No obstante, aunque Dll1 permite *in vitro* la diferenciación T, su

deleción no afecta al desarrollo T (*Jaleco y cols., 2001; Hozumi y cols., 2004; Lehar y cols., 2005*), mientras que la de Dll4 sí (*Koch y cols., 2008*).

Estudios posteriores han permitido un mejor conocimiento de la organización 3D del epitelio tímico y de los elementos celulares y moleculares que participan en ella. Irla y colaboradores desarrollaron un método automatizado para la reconstrucción 3D de órganos a partir de secciones inmunomarcadas (*Irla y cols., 2013*). Con este método se ha descrito la médula tímica como una gran estructura central rodeada de decenas de islotes medulares aislados o ligeramente conectados que muestran una topología fractal que aumenta el volumen medular en varios grados de magnitud, y con ello, la superficie del borde córtico-medular con mTECs AIRE⁺, confirmando estudios anteriores donde se apuntaba que la estructura medular era “retorcida” con focos irregulares y múltiples ramificaciones (*Anderson y cols., 2000*). También estos estudios, confirmando otros antes mencionados, indican la importancia de los linfocitos T CD4⁺ para el establecimiento de esta estructura 3D del epitelio mediante interacciones con él, en las que participa entre otras moléculas, LT α , cuya expresión aumenta tras estimulación del par CD80-CD86 (*Irla y cols., 2013*).

El papel de Foxn1 en la organización tridimensional del epitelio tímico y en el desarrollo de quistes, también es motivo de controversia. La aparición de quistes se asocia a la falta de interacciones timocitos-TECs, que colapsa el epitelio y bloquea su tridimensionalización (*Soza-Ried y cols., 2008*), pero mientras unos consideran que este proceso es independiente de Foxn1 otros insisten en que no hay tridimensionalización sin Foxn1 (*Pignata y cols., 1996; Guo y cols., 2011; Vigliano y cols., 2011*). También Xia y colaboradores (*Xia y cols., 2012*) demostraron que la caída de Foxn1 aceleraba el envejecimiento tímico y cursaba con aumento de quistes bidimensionales, descenso de la expresión de AIRE y TRAs, y alteraciones en la selección negativa que producían un síndrome autoinmune generalizado. El co-cultivo de células epidérmicas, donde también se expresa Foxn1, y progenitores hematopoyéticos configuran un microambiente tridimensional que expresa Foxn1 y reproduce un timo que puede formar células T funcionales (*Clark y cols., 2005*).

Por otra parte, los quistes pueden representar una vía de diferenciación minoritaria del epitelio tímico dentro del compartimento medular que aparecen después de que la especificación de linaje haya ocurrido o pueden ser un remanente del endodermo

faríngeo no especificado que se ha segregado del esbozo tímico durante el desarrollo. La presencia de quistes en timos de 16F (Dooley y cols., 2005) y la regular, pero menor distribución de los mismos en el timo postnatal (Khosla y Ovalle, 1986; Farr y cols., 2002), apuntan la posibilidad de que algunos quistes sean remanentes del conducto timofaríngeo (Dooley y cols., 2009; Munoz y cols., 2015), que establece el esbozo tímico temprano con el endodermo faríngeo del que deriva (Manley, 2000).

3.2.2. La maduración funcional del epitelio tímico

Admitida la relevancia de las interacciones epitelio-timocitos para la maduración funcional de ambos componentes tímicos, los mecanismos y el alcance de estas interacciones están lejos de estar claros.

En el caso del epitelio cortical los datos son escasos salvo por la relevancia de las interacciones péptido-MHC-TcR para la selección positiva, el papel de IL7, Dll4 y la selección TcR β en la proliferación y diferenciación de los timocitos y la participación de quimiocinas y moléculas de la matriz extracelular en el desplazamiento y localización de las distintas subpoblaciones de timocitos en los nichos corticales correctos; pero poco sabemos de las moléculas necesarias para la maduración del epitelio cortical. Defectos en Jagged 2, ligando de Notch como Dll1 y Dll2, cursan con cambios en la morfología del timo y bloqueo de la diferenciación de timocitos $\gamma\delta$ (Jiang y cols., 1998) pero su sobreexpresión, que hiperactiva Notch, produce apoptosis de TECs y atrofia tímica (Beverly y cols., 2006).

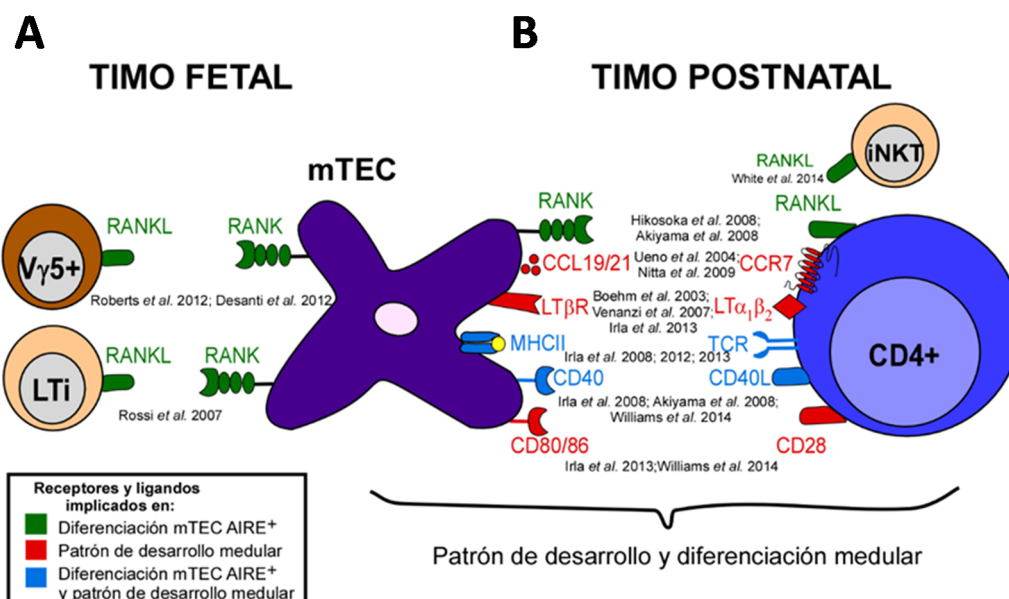
En la maduración del epitelio medular, aunque muchas moléculas implicadas están por identificar, juegan un papel primordial algunos miembros de la superfamilia de receptores del TNF (*tumor necrosis factor*), como RANK, CD40, LT β R, que se expresan en mTECs, y sus correspondientes vías de señalización.

En general, alteraciones en la señalización RANK-RANKL bloquean el desarrollo de mTECs y producen fallos en la tolerancia central. La interacción de RANK con su ligando, RANKL, inicia la formación y maduración de mTECs. En el timo embrionario, la señal de RANK es activada a través de RANKL expresado en células inductoras linfoides ROR γ t⁺ (LTi) y células T canónicas V γ 5⁺ que promueven la maduración de células CD80⁻ AIRE⁻ a células CD80⁺AIRE⁺ (Rossi y cols., 2007b; Roberts y cols., 2012). Datos recientes sugieren que células iNKT también participan en la maduración del epitelio tímico

porque ratones CD1d^{-/-}, que no contienen estas células, muestran valores bajos de mTECs AIRE⁺. Estas células, además, expresan RANKL y CD40L en los primeros estadios de desarrollo disminuyendo después (*White y cols., 2014*) (**Esquema 10A**). En el timo adulto, la activación está mediada por timocitos SP CD4⁺ seleccionados positivamente (*Klein y cols., 2014; Shah y Zuniga-Pflucker, 2014*) (**Esquema 10B**). Sin embargo, se pueden generar células mTEC AIRE⁺ en ausencia de timocitos puesto que ratones deficientes en las moléculas MHCI y MHCII (*White y cols., 2008*) o deficientes en la cadena TcRα (*Hikosaka y cols., 2008*), donde no hay selección positiva de timocitos, contienen células mTEC AIRE⁺. Es posible, por tanto, que en el timo adulto haya otras fuentes de RANKL que afecten el desarrollo de las mTECs (*Anderson y cols., 2009*).

La ruptura postnatal de dicha señalización cursa con caída del número de mTECs maduras UEA1⁺CD80^{hi}MHCII^{hi} y autoinmunidad (*Akiyama y cols., 2008; Hikosaka y cols., 2008*), y el trasplante de timos o esplenocitos RANKL^{-/-} en ratones deficientes produce inflamación severa y abundantes auto-anticuerpos (*Rossi y cols., 2007b; Akiyama y cols., 2008*). Por el contrario, la sobre-expresión de RANKL en los timocitos induce expansión medular que afecta a todas las poblaciones de mTECs, incluyendo a las células maduras, y reducción casi total de la corteza (*Danzl y cols., 2014*). También, ratones deficientes en osteoprotegerina (OPG), un receptor *decoy* de RANKL, cursa con hiperplasia tímica y aumento de mTECs maduras (*Hikosaka y cols., 2008*). Más recientemente, se han identificado varias subpoblaciones RANK⁺, tanto en mTEC^{hi} como en mTEC^{lo}, independientemente de la expresión de AIRE. Por su parte, OPG sólo se expresa en células mTEC^{hi}AIRE⁺ y parece controlar la homeostasis de las poblaciones medulares tanto de mTEC^{hi} como de mTEC^{lo} (*Lucas y cols., 2016*).

La señalización CD40-CD40L también es importante para la correcta organización del microambiente tímico (**Esquema 10B**). Así, en el timo postnatal CD40L, expresado por timocitos CD4⁺ y CD8⁺ seleccionados positivamente, es necesario para la maduración de mTECs, pero los efectos de su ausencia son menos severos que en el caso de la falta de RANK/RANKL. Puesto que dichos efectos son mayores en dobles KO de RANKL y CD40, hay que suponer que ambas vías de señalización cooperan en la maduración del epitelio medular (*Akiyama y cols., 2008; Hikosaka y cols., 2008; Irla y cols., 2008*).



Esquema 10. Tipos celulares y señalización implicados en el desarrollo medular. (A) En el timo fetal, las células V γ 5⁺ y LTi expresan RANKL (verde), mientras que en el postnatal (B) lo hacen las células iNKT y los timocitos CD4⁺ e inducen la diferenciación de mTECs AIRE⁺. Además, en el timo postnatal, existe un *crossstalk* entre mTECs y CD4⁺ vía CCL19/21—CCR7, LT β R—LT α β 2, y CD80/86—CD28 (rojo) que controla el patrón de desarrollo medular, mientras que MHCII—péptido—TCR y CD40—CD40L (azul) contribuyen no sólo al patrón de desarrollo medular sino también a la diferenciación de las mTEC AIRE⁺. Adaptado de Lopes y cols., 2015.

Otro miembro importante de la superfamilia TNFR es LT β R. Este receptor tiene dos ligandos, LT α β 2 (subunidad LT α y LT β) y LIGHT (Irla y cols., 2008) que se expresan en timocitos SP (Esquema 10B). En ausencia de cualquiera de estas tres moléculas o de cualquiera implicada en su vía de señalización después de NIK (NF- κ B inducing kinase) se producen alteraciones medulares como desorganización histológica, caída del número de mTECs totales, bloqueo de la maduración T y autoinmunidad (Boehm y cols., 2003; Venanzi y cols., 2007). Puesto que el fenotipo observado en ausencia del receptor es más severo que aquel que se produce cuando no hay ligandos, hay que pensar que otros ligandos no identificados podrían participar también en el proceso (Boehm y cols., 2003). Además, el papel jugado en la expresión de AIRE y TRAs no está claro. Algunos autores (Chin y cols., 2003), pero no otros (Martins y cols., 2008), apuntan que la señalización LT β R es necesaria para la expresión de TRAs tanto AIRE-dependientes como AIRE-independientes. Otros sólo la asocian con la expresión de TRAs AIRE-independientes (Chin y cols., 2006; Seach y cols., 2008) sugiriendo que esta señalización y AIRE no guardan relación (Venanzi y cols., 2007). Por otro lado, ratones deficientes en LT α o LT β tienen expresiones normales de CD80, CD40, AIRE y TRAs,

pero médulas pequeñas (Martins y cols., 2008; Seach y cols., 2008). De nuevo, dos moléculas de la familia TNFR podrían cooperar en la regulación del desarrollo medular. La señalización $LT\beta R$ podría up-regular la expresión de RANK promoviendo su activación y la diferenciación de mTECs explicando porque los dobles KO para $LT\beta R$ y RANKL son más severos que los simples (Mouri y cols., 2011). Además, aunque el desarrollo inicial de mTEC $AIRE^-$ requiere RANK, su maduración terminal a mTEC involucrina⁺ parece requerir señalización $LT\alpha$ - $LT\beta R$ proporcionada por timocitos maduros (White y cols., 2010).

Estudios sobre moléculas implicadas en la vía de señalización canónica y no canónica de los TNFR confirman la relevancia de esta familia molecular en la maduración funcional del epitelio medular tímico (Zhu y Fu, 2010). RANK y CD40 inician la vía canónica de NF κ B a través de TRAF6 (*TNFR associated factor 6*) y los ratones TRAF6^{-/-} muestran profundas alteraciones de la estructura medular con pérdida de mTECs UEA1⁺ (Akiyama y cols., 2005). En ausencia de moléculas de la vía no canónica de NF κ B (NIK, IKK α y RelB) también hay alteraciones tímicas con reducción de mTECs UEA1⁺ y/o $AIRE^+$ (Burkly y cols., 1995; Weih y cols., 1995; Kajiura y cols., 2004; Kinoshita y cols., 2006; Lomada y cols., 2007). Igualmente, ratones NF κ B2^{-/-} muestran un importante descenso de mTEC maduras (CD80^{hi}), baja expresión de $AIRE$ y autoinmunidad (Zhang y cols., 2006; Zhu y cols., 2006). La ausencia de Relb cursa con falta de células Cld3,4^{hi}RANK⁺, sugiriendo que Relb es un regulador para la generación de progenitores epiteliales RANK⁺ determinando el momento exacto del desarrollo del linaje medular (Baik y cols., 2016).

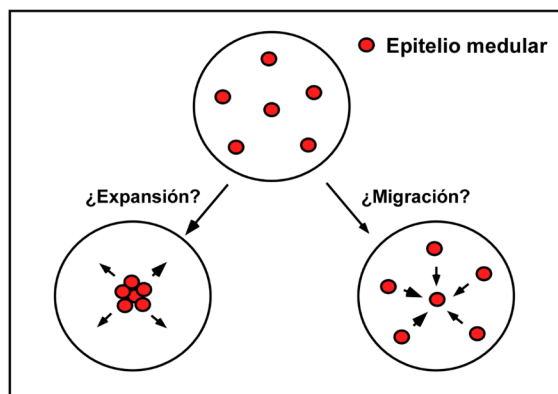
También Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) parece implicado en el desarrollo de las mTECs (Lomada y cols., 2016). Su activación constitutiva en mTECs incrementa la celularidad medular, mientras su delección condicionada la reduce y produce alteraciones en la formación del compartimento medular. Aparentemente, la sobreexpresión de Stat3 obvia las señales mediadas por los timocitos seleccionados positivamente para la formación del compartimento medular (Lomada y cols., 2016). Otros autores, por el contrario, han descrito un ratón con Stat3 delecionado específicamente en células K5⁺ que muestran un timo hipoplásico, con reducción de timocitos DP y atrofia cortical, pero desarrollo aparentemente normal de la médula (Sano y cols., 2001).

Sin, una molécula ya descrita por su implicación en la organogénesis tímica, se expresa en mTECs pero no en cTECs (Danzl y cols., 2010) y parece estar implicada en la diferenciación del epitelio medular porque su ausencia cursa con autoinmunidad, desorganización medular y reducción de mTECs maduras UEA1⁺MHCII^{hi}AIRE⁺, así como en la expresión de TRAs dependientes e independientes de AIRE (Alexandropoulos y Danzl, 2012). La vía del receptor FGF podría estar implicada (su relación con Sin ya ha sido mencionada) en estos fenotipos, porque en ratones Sin^{-/-} la inyección de KGF (*keratinocyte growth factor*) o FGF7 no aumenta la proliferación de las TECs, aunque el desarrollo del epitelio medular no se bloquea por completo. La vía de RANK podría también estar implicada porque la inyección de RANKL, como la de FGF7, en ratones Rag^{-/-} aumenta la expresión de Sin. Además, Sin activa mediadores *downstream* de las vías FGFR2IIIb y RANK por lo que su ausencia podría alterar los papeles que dichas vías tienen en la proliferación y maduración del epitelio tímico (Alexandropoulos y Danzl, 2012).

4. MECANISMOS DE ORGANOGÉNESIS/HISTOGÉNESIS Y SU RELACIÓN CON LA DIFERENCIACIÓN DEL EPITELIO TÍMICO

Pocos trabajos se han ocupado del desarrollo tímico desde la perspectiva de los mecanismos que determinan su organogénesis y, en general, los que lo han hecho se han centrado en el origen de la médula. Rodewald y colaboradores (Rodewald y cols., 2001) utilizaron ratones quiméricos para moléculas del MHC para demostrar que las primeras células que expresaban marcadores medulares aparecían como grupos (islas) independientes, surgidas a partir de una célula única. Según estos autores, posteriormente estas islas se reúnen en una médula única como la del timo adulto (Anderson y cols., 2000; Rodewald y cols., 2001) (**Esquema 11**). Se ha apuntado también que cada isla refleja la diferenciación corteza/médula de un solo precursor común presente en el esbozo tímico de 12F, de manera que cada célula tomada de la masa tímica original daría lugar a cTECs y mTECs (Bleul y cols., 2006). También, RTOCs establecidos con combinaciones de células WT y *nude* en distintas proporciones dan timos con un número de TECs proporcional al número inicial de precursores WT (Jenkinson y cols., 2008), lo que sugirió que el número de islotes medulares

correspondía al número inicial de progenitores del primordio tímico temprano (Rodewald, 2008). Como antes indicábamos, Hamazaki y colaboradores (Hamazaki y cols., 2007) indicaron que las mTEC AIRE⁺ eran Cld3,4⁺ y se generaban a partir de células Cld3,4⁺AIRE⁻ y éstas de Cld3,4⁻. Las células Cld3,4⁺ aparecen en la luz del epitelio polarizado de 10.5F, después asociadas a MTS10 y luego a UEA1 a 13.5F. Cuando el primordio se reorganiza, las células Cld3,4⁻ con capacidad de dar cTECs y mTECs, darán células Cld3,4⁺ comprometidas con el linaje medular (Hamazaki y cols., 2007; Hollander, 2007). A 13.5F el compromiso córtico/medular ya está establecido y con la colonización linfoide el timo crece y los esbozos de corteza y médula se organizan tridimensionalmente (Manley, 2000).



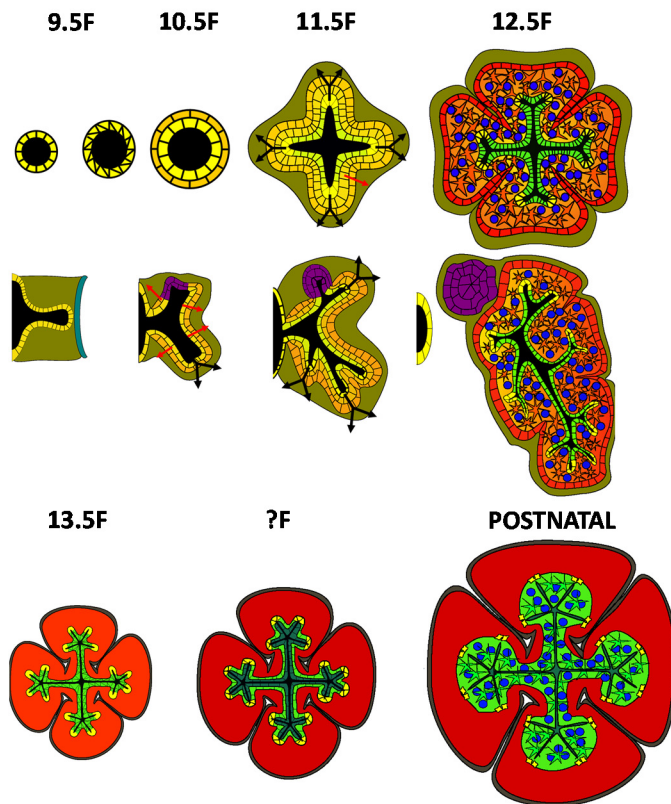
Esquema 11. Esquema representativo de la formación de la médula tímica. La médula tímica se podría formar por migración de pequeñas “islas” de epitelio medular, o por expansión de las mismas hasta formar un área medular única, típica del timo adulto. Adaptado de Rodewald y cols., 2001.

Recientemente, nuestro grupo propuso un modelo alternativo de organogénesis tímica (Munoz y cols., 2015) donde proliferación y diferenciación de las TECs se vinculan a la localización de las áreas corticales y medulares en el esbozo tímico temprano. A 10.5F el primordio tímico es un epitelio biestratificado que expresa apicalmente Cld3,4 y proteínas ZO (*Zonula Occludens*), demostrando la polarización del epitelio tímico en torno al lumen central ya apuntada por Hamazaki y colaboradores (Hamazaki y cols., 2007). Un día después, el primordio expresa homogéneamente MTS20/24 y K8 y hacia el final de ese estadio aparece la expresión de K5, especialmente en la parte central. En este estadio, el lumen central limitado por células K5⁺Cld3,4⁺ muestra una incipiente ramificación, cuyo crecimiento dará lugar a lobulillos. A 13.5F, el grado de ramificación aumenta y las células Cld3,4⁺ forman cordones que definen microlúmenes y alineamientos superficiales. Se trata, por tanto, de un proceso de morfogénesis

ramificada similar al de otros órganos epiteliales particularmente al del primordio pancreático (*Patel y cols., 2011*).

A nivel celular entre 12.5F y 13.5F, MTS10 se regula positivamente en las células Cld3,4⁺ siguiendo una secuencia continua y progresiva tronco-rama. Por tanto, si estas células son las progenitoras del epitelio medular, la médula tímica debe diferenciar como una estructura continua y ramificada a partir de células del lumen o que forman lumen *de novo* durante el desarrollo de la masa epitelial tímica. Nuestro modelo propone, por tanto, que las células en el centro de la masa epitelial polarizan y alinean en cordones epiteliales, adquieren polaridad apical-basal y forman uniones que permiten la aparición de lúmenes y microlúmenes que se unen en uno continuo formado por células Cld3,4⁺ que darán lugar a la médula tímica (*Munoz y cols., 2015*). Sobre esta base inicial, la llegada de los progenitores linfoides genera una red 3D que modifica las polaridades celulares y dificulta la identificación de la estructura epitelial. Así, a partir de 14F ni las células medulares desarrollan lumen ni la masa epitelial continua formando túbulos y estructuras distales, si no que permanece con una organización concéntrica central sin evidencia de lumen, rodeada de una corteza (**Esquema 12**).

Este modelo ha sido confirmado recientemente (*Tobajas, 2015*) analizando comparativamente la morfología del timo de animales en los que falta algunos de los principales elementos reguladores de la diferenciación epitelial, Foxn1 y/o timocitos. Estos resultados demuestran que la expresión de Foxn1 impide la polarización de las células de la masa epitelial y bloquea la formación de lumen lo que produce una menor diferenciación apical que impide la regulación positiva de Cld3,4 pero no la de MTS10 o K5. La presencia de timocitos revierte parcialmente este efecto inhibitorio de Foxn1 sobre la tubulogénesis, permitiendo la continuidad del epitelio medular. La diferenciación corteza/médula sucede, como antes indicábamos, de acuerdo a un modelo de diferenciación asimétrica: muchas mTECs provienen de TECs CD205⁺ que regulan positivamente la expresión de MTS10 y negativamente la de CD205, mientras sufren diferenciación apical. Las células linfoides inducen, además, diferenciación medular: las células Cld3,4⁺ adquieren la expresión de AIRE y de CD80 mientras las MTS10⁺ sólo expresan CD80.



Esquema 12. Organogénesis tímica de acuerdo a un patrón de morfogénesis ramificada. El esbozo tímico surge como una evaginación del tercer arco faríngeo (9.5F) que sufre inicialmente un proceso de estratificación, ramificación y crecimiento longitudinal. A 11.5F, el primordio tímico comienza a expresar marcadores de epitelio medular en el borde luminal (verde), mientras continúa estratificando, ramificando y creciendo longitudinalmente. Con la llegada de los primeros progenitores linfoides (11.5F-12.5F), la capa apical mantiene los marcadores medulares mientras la más externa los pierde y comienza a expresar marcadores corticales (rojo). El compromiso medular queda definitivamente determinado a partir de 13.5F, quedando en los extremos de las ramificaciones presumiblemente progenitores bipotentes (amarillo). A partir de entonces, la zona apical queda como médula pero ya no desarrolla lumen ni túbulos o estructuras distales quedando como una estructura 3D concéntrica central rodeada por una corteza consecuencia de la expansión de la zona externa. *Adaptado de Muñoz, JJ. 2010, Tesis doctoral.*

5. EPH Y EPHRINA: NUEVOS REGULADORES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN TÍMICA

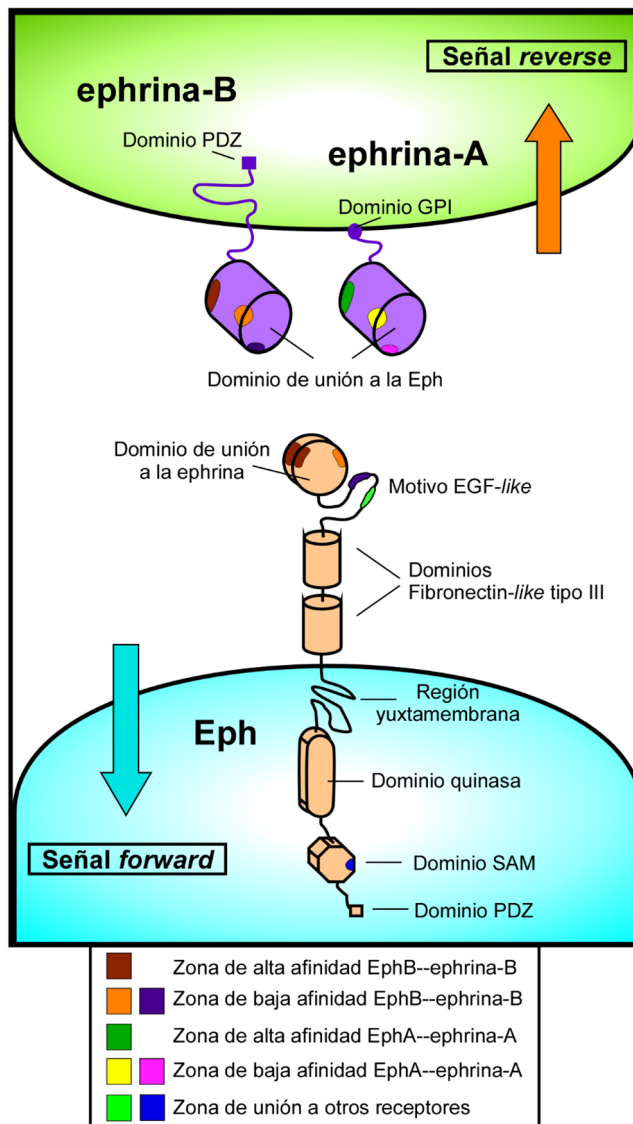
5.1. La familia de las Eph y las ephrinas

Ephs (*Erythropoietin-producing hepatocyte kinases*) constituyen la mayor familia de receptores tirosinaquinasa (PTK) celulares. Sus ligandos, ephrinas (*Eph receptor interaction proteins*) son también proteínas asociadas a la membrana plasmática. La señalización mediada por ambas familias de moléculas proporciona información posicional a las células y regula contactos célula a célula, célula-matriz extracelular, migración celular, supervivencia y diferenciación celular (*García-Ceca y cols., 2015*), contribuyendo a numerosos procesos morfogénéticos así como a la homeostasis de los tejidos adultos.

Eph y ephrinas se subdividen en dos grandes familias cada una, sobre la base de la homología de sus secuencias génicas y su afinidad por Ephs o ephrinas (**Esquema 13**). Las EphA (10 miembros) interaccionan preferente, aunque no exclusivamente, con los 6 miembros de la subfamilia A de ephrinas, que son moléculas “ancladas” a la membrana plasmática a través de residuos de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (**Esquema 13**). Por su parte, la subfamilia de EphB (6 miembros) interacciona con ephrinas-B (3 miembros) que muestran un dominio de transmembrana y una corta cola citoplásmica que incluye residuos de tirosina (Tyr) y un dominio de unión a motivos PDZ próximo al carboxilo terminal (*Gale y cols., 1996*) (**Esquema 13**). Como decíamos, hay excepciones a este modelo general: la ephrina-A5 es capaz de interaccionar con EphB2 (*Himanen y cols., 2004*) y distintas ephrinas-B, pueden interaccionar con EphA4 (*Gale y cols., 1996*). Más recientemente, se ha demostrado que EphA4 une con alta afinidad ephrina-B2, mientras que EphB2 es capaz de unirse con baja afinidad a las ephrinas-A1, -A2, -A3 y -A5, y con alta a ephrina-A4. Por último, se ha visto que la ephrina-A4 se une a todos los receptores EphB, con la excepción de EphB4 y EphB6 (*Noberini y cols., 2012*).

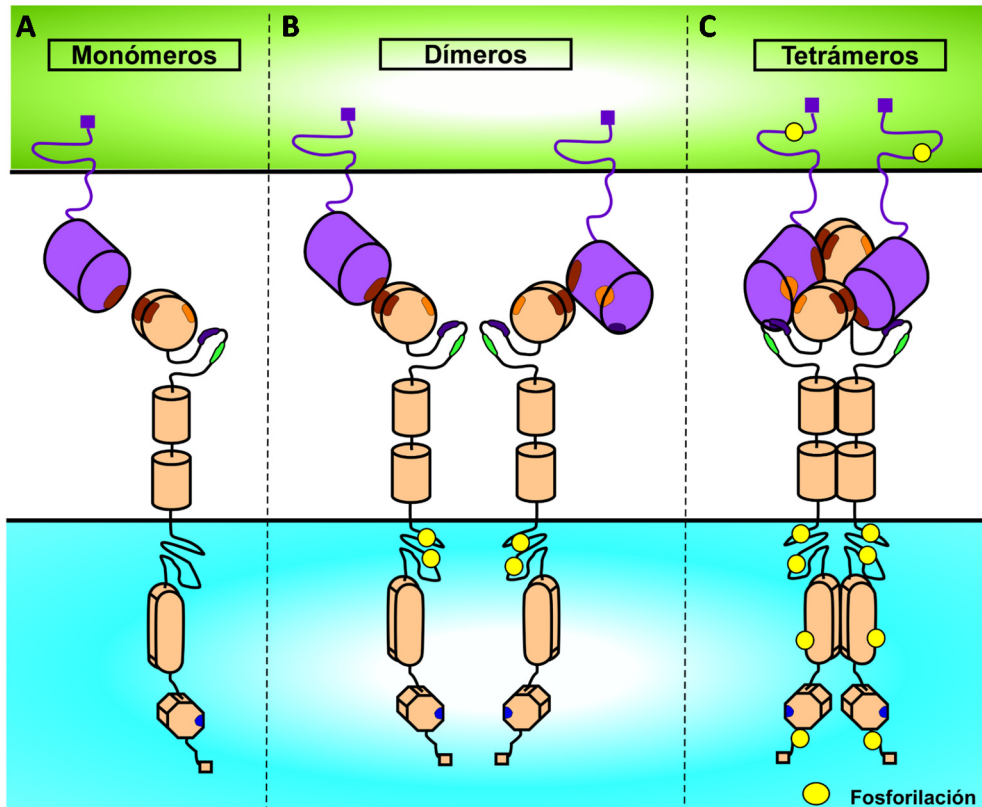
Las Eph son PTK con un dominio transmembrana, otro extracelular correspondiente al amino terminal que contiene el sitio de unión al ligando, una región rica en cisteínas con motivos *EGF-like* y dos dominios repetidos *Fibronectin-like* tipo III. En el lado citosólico, hay una región yuxtamembrana con dos Tyr conservadas, un dominio quinasa, un motivo α estéril (SAM) y un motivo de unión a PDZ en el carboxilo terminal (*Kullander y Klein, 2002*) (**Esquema 13**).

El sistema es particularmente ubicuo no sólo por el alto número de miembros que incluye y porque un solo receptor puede unir varios ligandos, aunque con distinta afinidad, y viceversa (*Pasquale, 2008*), si no porque las interacciones Eph/ephrinas transmiten señales bidireccionales, *forward* en la célula que expresa la Eph y *reverse* en la que expresa la ephrina (*Knoll y Drescher, 2002*), lo que resulta en distintas respuestas celulares dependiendo de la dirección de la señalización y permite múltiples combinaciones de señales dado que Eph y ephrinas pueden expresarse conjuntamente en la misma célula (**Esquema 13**). Además, algunas Eph pueden activarse independientemente de ligando (*Pasquale, 2008*).



Esquema 13. Estructura molecular de Ephs y ephrinas. Las Eph son receptores tirosina quinasa que muestran un dominio extracelular correspondiente a la región amino terminal que contiene el sitio de unión al ligando. En este dominio, hay una región rica en cisteínas similar a la existente en el factor de crecimiento epidérmico (EGF), motivo EGF-like, y dos dominios repetidos Fibronectin-like tipo III, implicados en la dimerización del receptor. A continuación, hay un corto dominio transmembrana y, finalmente, un dominio citosólico, caracterizado por la presencia de una región yuxtamembrana con dos residuos de tirosina conservadas, un dominio quinasa, un dominio SAM y un dominio de unión PDZ en el extremo carboxilo terminal. Las ephrinas-A son moléculas “ancladas” a la membrana plasmática a través de residuos de glicosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que las ephrinas-B muestran un dominio transmembrana, y una corta región citosólica que incluye residuos de tirosina y un dominio de unión PDZ en el extremo carboxilo. Además, tanto receptores como ligandos presentan diferentes zonas de alta o baja afinidad esencial para la transmisión de las señales (ver cuadro adjunto a la figura). Adaptado de Pasquale, 2005.

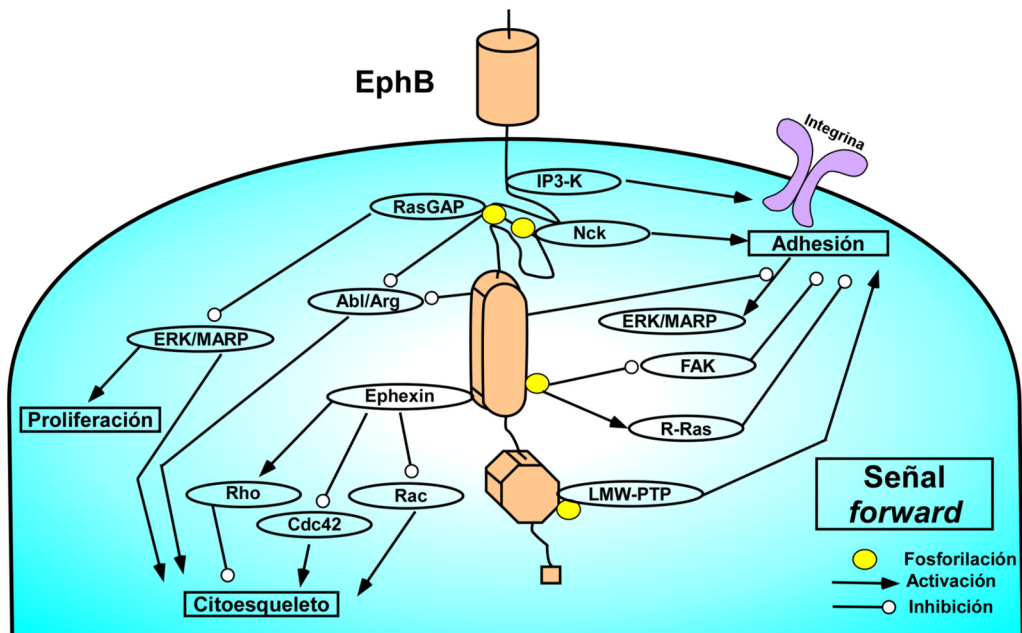
La señalización Eph/ephrinas es dependiente de la oligomerización de receptores y ligandos (Himanen y Nikolov, 2003; Nikolov y cols., 2005) y también puede ser modulada por la agregación de los receptores lo que puede generar incluso respuestas opuestas (Stein y cols., 1998). Los sitios de alta afinidad (de orden nM) en estas moléculas forman heterodímeros tras el contacto inicial ligando-receptor, mientras los de baja (de orden μ M) favorecen la formación de tetrámeros a partir de heterodímeros. La dimerización es suficiente para la fosforilación del dominio de yuxtamembrana, mientras la tetramerización fosforila el resto de residuos de Tyr de la molécula (Kullander y Klein, 2002) (Esquema 14).



Esquema 14. Interacción entre Eph y ephrina. La interacción Eph-ephrina requiere contacto célula-célula debido a que ambas moléculas están ancladas a la membrana celular. Una vez producida esta interacción (A), la activación de la señalización Eph-ephrina conlleva una dimerización (B) y posterior tetramerización (C). El primer contacto entre receptor y ligando implica la formación de complejos diméricos (B) a partir de los monoméricos (A). Los dímeros se forman a través de los dominios EGF-like, lo que provoca la fosforilación (círculos amarillos) de los residuos de tirosina en el dominio yuxtamembrana, y la preparación para la activación del receptor y del ligando, debido a un cambio conformacional. A continuación, y gracias a las zonas de baja afinidad, se facilita la formación de tetrámeros, haciendo extensiva la fosforilación a otros dominios de la Eph y de los residuos de tirosina en el caso de las ephrinas-B. *Adaptado de Pasquale, 2005.*

Estas últimas fosforilaciones inician una cascada de señalización *forward* dependiente del dominio PTK vía GTPasas de la familia Rho, y ERK/MAPK, o independientemente de él, a través del dominio de yuxtamembrana cuyas Tyr fosforiladas se unen a proteínas adaptadoras que, a su vez, inhiben la ruta ERK/MAPK (**Esquema 15**). La señal *forward* está implicada fundamentalmente en procesos de adhesión y re-organización del citoesqueleto a través de la regulación de la expresión de integrinas. Los efectos sobre la adhesión celular están mediados por tres vías: 1) la expresión de integrinas vía reclutamiento de LMW-PTP (*low molecular weight- protein-tyrosine phosphatase*) a su dominio SAM; 2) la fosforilación de las Tyr del dominio yuxtamembrana a través de IP3-K; y 3) la disminución de la expresión de las integrinas a través de las rutas R-Ras o FAK (*focal adhesion kinase*), activadas tras fosforilación del dominio quinasa. Los

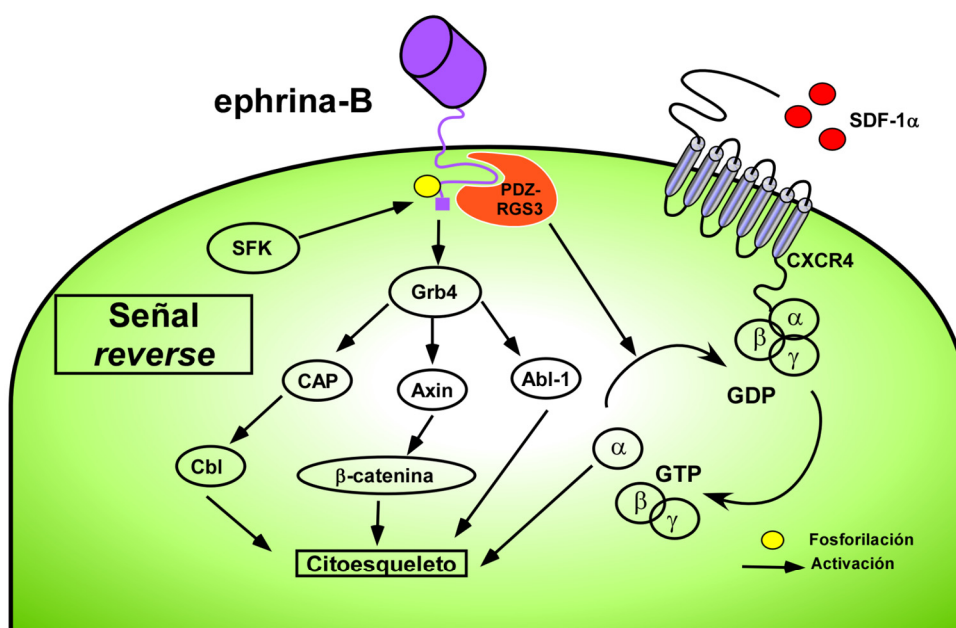
efectos sobre el citoesqueleto operan por dos vías distintas: una dependiente de la activación de la tirosina quinasa con el concurso de la GTPasa Rho, que activa RhoA e inhibe Cdc42 y Rac1; y otra, independiente de la tirosinaquinasa, vía fosforilación de las Tyr del dominio de yuxtamembrana, que, a su vez, unen proteínas adaptadoras (Abl, Arg) o Ras-GAP que inhibe la vía ERK/MAPK (**Esquema 15**).



Esquema 15. Señalización *forward* mediada a través de los receptores EphB. El esquema muestra las rutas de señalización activadas o inhibidas tras la activación de un receptor EphB. Tal y como se representa en la imagen, la cascada de señalización *forward* está implicada fundamentalmente en regular vías de señalización que intervienen en controlar procesos de adhesión celular, modulando para ello la expresión de integrinas. También regulan rutas que controlan la organización del citoesqueleto de actina y las implicadas en proliferación celular. *Adaptado de Kullander y Klein, 2002.*

La activación de las ephrinas-A a través del dominio GPI y su interacción en *raft* lipídicas con otras moléculas potencia la adhesión dependiente de integrinas a través de MAPK. La fosforilación dependiente de receptor se relaciona con la dinámica del citoesqueleto, provocando pérdida de adhesión y alteraciones en la morfología celular, a través de la desorganización del citoesqueleto de actina y de las adhesiones focales (Cowan y Henkemeyer, 2001). La señalización *reverse* activa la PTK Src, Fyn que, a su vez, activa las MAKs que potencian la expresión de integrinas y, con ello, la adhesión. La cascada de señalización de las ephrinas-B empieza con la fosforilación de las Tyr citoplásmicas, lo que, de nuevo, puede realizarse de varias maneras: 1) dependiendo de la unión a la Eph, lo que conlleva el reclutamiento de SFK (*Src family kinase*), que fosforila las Tyr de la ephrina y recluta Grb4, un adaptador con un dominio SH3 que

una proteína reguladora del citoesqueleto como CAP (*c-Cbl associated protein*) y Cbl que regulan fibras de stress y adhesiones focales; y 2) independiente de la interacción con el receptor, mediado a través del dominio de unión a PDZ de las ephrinas, que interacciona con dos tipos de proteínas: adaptadoras y con dominio PDZ (PDZ-RGS3 *Regulator of heterotrimeric G protein signaling*), que contienen un dominio regulador de proteínas G heterotriméricas, que afecta, por ejemplo a CXCR4, el receptor de la quimiocina CXCL12 (SDF-1 α) (**Esquema 16**).



Esquema 16. Señalización *reverse* mediada a través de ephrinas-B. La cascada de señalización *reverse* tras la activación de la ephrina-B fundamentalmente activa aquellas rutas de transmisión de señales que intervienen en controlar los reordenamientos del citoesqueleto de actina a partir de la activación de Grb4. Además, es capaz de inhibir el efecto de la activación del receptor CXCR4 tras la unión con su ligando, la quimiocina SDF-1 α (CXCL12). Adaptado de Kullander y Klein, 2002.

5.2. Papel de Eph y ephrinas en la biología del timo

Los trabajos acerca del posible papel de Eph y ephrinas en el sistema inmune son escasos y hacen referencia básicamente a su capacidad para actuar como moléculas co-estimuladoras que modulan la señal transmitida por el complejo TcR-CD3 (Wu y Luo, 2005; Freywald y cols., 2006) o como reguladoras de la migración celular en respuesta a quimiocinas (Sharfe y cols., 2002) o de la adhesión mediada por integrinas (de Saint-Vis y cols., 2003; Aasheim y cols., 2005; Zamora y cols., 2006; Hjorthaug y Aasheim, 2007; Sharfe y cols., 2008). Puesto que el objetivo de este trabajo es profundizar en el

origen y significado del fenotipo epitelial observado en el timo de ratones deficientes en EphB2 o EphB3 (*García-Ceca y cols., 2009a*) nos centraremos, principalmente, en los trabajos referidos al timo. En resumen, diríamos entonces que la ausencia de Eph y/o ephrinas cursa siempre con: hipocelularidad que, sin embargo, en los pocos casos en que ha sido estudiada con algo de profundidad, obedece a distintos motivos; alteraciones en la diferenciación T que rara vez se ha podido correlacionar con deficiencias o alteraciones inmunológicas; y, modificaciones del componente epitelial tímico que afectan a veces, o son parcialmente responsables, de los cambios en la diferenciación T. Nos centraremos, por tanto, en estos aspectos del papel de Eph y ephrinas en la biología del timo.

Además, todos estos cambios parecen tener tres características importantes que nos ayudarán a explicar los resultados de nuestro trabajo: aparecen pronto en la ontogenia; pueden relacionarse, al menos parcialmente, con alteraciones en las interacciones TEC-timocitos mediadas por Eph y ephrinas, y son específicas de las Eph o ephrinas implicadas.

5.2.1. Expresión

Ephs y ephrinas están ampliamente representadas en el timo (**Tabla A**), aunque los resultados son contradictorios respecto a su distribución en los distintos territorios tímicos y su expresión en diferentes tipos celulares linfoides y no linfoides, lo que, presumiblemente refleja los distintos métodos utilizados en su detección y/o diferencias especie específicas.

Dentro de la subfamilia A, EphA1, EphA2, EphA4 y EphA7 son expresadas tanto en timocitos como en TECs, mientras que EphA3 sólo se ha descrito en los primeros (*Munoz y cols., 2002; Sharfe y cols., 2002; Vergara-Silva y cols., 2002*). En ratón, la expresión de ephrinas se ha circunscrito exclusivamente a los timocitos, pero en rata ephrina-A1, ephrina-A2 y ephrina-A5 se expresan en TECs (*Munoz y cols., 2002*). Respecto de su distribución en el órgano, los estudios inmunohistoquímicos demostraron que los timocitos subcapsulares de rata expresaban ephrinas-A1, -A2, -A3 y -A4, estando ephrina-A2 también representada en la médula tímica, solapando parcialmente con la expresión de ephrina-A5 (*Munoz y cols., 2002*). Por el contrario, en timo murino ephrina-A2 aparece por todo el órgano y ephrinas-A1 y -A5 solamente en

la corteza y en la zona subcapsular (*Vergara-Silva y cols., 2002*). En el caso de la subfamilia B, todas las EphB se expresan en timo y lo hacen por todo el órgano (*Shimoyama y cols., 2000; Yu y cols., 2006; Alfaro y cols., 2008*), pero otros autores restringen la expresión de ephrina-B1 a la región subcapsular (*Coles y cols., 2004*). La expresión de ephrinas-B1 y -B2 se ha descrito en corteza co-localizando con EphB6, que predomina en timocitos DP (*Shimoyama y cols., 2000; Luo y cols., 2001*). En timo humano también se expresan ephrina-B2 y EphB6, aunque más débilmente que en ratón (*Munthe y cols., 2000*). Estudios inmunohistoquímicos y utilizando RT-PCR demuestran que las dos Eph, EphB2 y EphB3, objeto de este trabajo y sus ligandos, ephrinas-B1 y -B2 se expresan tanto en timocitos como en TECs (*Shimoyama y cols., 2000; Alfaro y cols., 2008*). Otros datos indican que ephrina-B1 y -B2 se expresaban especialmente en el epitelio cortical, junto con EphB4 y EphB6, mientras EphB2 y EphB3 lo hacían en la médula (*Cejalvo, 2011*). Aparentemente, estas cuatro moléculas se expresan en todas las subpoblaciones de timocitos, aparte de en las TECs, tanto fetales como adultas (*Alfaro y cols., 2008*). Otros autores han confirmado estos resultados con ligeras diferencias utilizando citometría de flujo, aunque los resultados son muy escasos. Por otro lado, Coles y colaboradores (*Coles y cols., 2004*) describieron que el 65% de DN expresan EphB2, y Shimoyama y colaboradores (*Shimoyama y cols., 2002*) describieron que la proteína de fusión ephrina-B1Fc interaccionaba con DN fetales. Aparte de su expresión en timocitos y TECs, EphB6 y ephrina-B1 se expresan fuertemente en DC tímicas de rata (*Munoz y cols., 2002*). Estudios recientes de nuestro grupo utilizando PCR cuantitativa de células epiteliales EpCAM⁺CD45⁻ demuestran que las EphB aquí estudiadas y sus ligandos, ephrinas-B1 y -B2 se expresaban ya en el epitelio tímico de 12F y sus niveles se regulan a lo largo del desarrollo: ephrina-B2 positivamente y ephrina-B3 negativamente; no había variaciones en el caso de ephrina-B1; EphB4 también se regulaba positivamente mientras EphB1, EphB2 y EphB3 lo hacían negativamente (*Cejalvo, 2011*).

Molécula	Expresión	Función	Referencia
EphA1, A2, A3, A4, A7, A8	Timocitos y TECs	-Supervivencia y diferenciación de las células T -Organización del epitelio cortical (EphA4) -Quimiotaxis de timocitos (EphA1-A4)	-Muñoz y cols., 2002 y 2004 -Sharfe y cols., 2002 -Vergara-Silva y cols., 2002
EphB1	Timocitos	-Quimiotaxis de timocitos	-Sharfe y cols., 2002
EphB2, B3	Timocitos y TECs	-Quimiotaxis de timocitos -Migración de los progenitores linfoides al timo y dentro del mismo -Diferenciación de las células T -Organización de la red epitelial -Supervivencia de las TECs	-Sharfe y cols., 2002 -Coles y cols., 2004 -Stimamiglio y cols., 2010 -García-Ceca y cols., 2009 -Alfaro y cols., 2008 y 2011 -Cejalvo 2011, Tesis doctoral
EphB4	TECs	ND	-Cejalvo 2011, Tesis doctoral -Jin y cols., 2014
EphB6	Timocitos y TECs	-Proliferación de células T periféricas -Coestimulación de células T periféricas	-Shimoyama y cols., 2000 -Luo y cols., 2001 -Freywald y cols., 2003 -Jin y cols., 2014
Ephrina-A1	Timocitos	-Quimiotaxis de los timocitos -Apoptosis de los timocitos DP	-Sharfe y cols., 2002 -Aasheim y cols., 2005 -Freywald y cols., 2006
Ephrina-A2, -A4, -A5	Timocitos y TECs	-Quimiotaxis de los timocitos	-Sharfe y cols., 2002 -Muñoz y cols., 2002
Ephrina-A3	Timocitos	-Quimiotaxis de los timocitos	-Sharfe y cols., 2002 -Muñoz y cols., 2002
Ephrina-B1, -B2, -B3	Timocitos y TECs	-Quimiotaxis de los timocitos -Modulación de la señalización TcR (ephrina-B1) -Organización del primordio tímico (ephrina-B2) -Organización TEC y diferenciación de los timocitos (ephrina-B1 y -B2)	-Aasheim y cols., 2005 -Freywald y cols., 2003 -Yu y cols., 2006 -Alfaro y cols., 2008 -Foster y cols., 2010 -Cejalvo 2011, Tesis doctoral -Jin y cols., 2014

Tabla A. Expresión y función de las Ephs y ephrinas en el timo. ND: no determinado. Adaptado de *Mendes-da-Cruz y cols., 2012*.

5.2.2. Celularidad tímica, Eph y ephrinas

Eph y ephrinas han sido implicadas en la celularidad y el tamaño de numerosos órganos en relación con alteraciones en los niveles de muerte y proliferación celular (*Yue y cols., 1999; Gao y cols., 2000; Depaepe y cols., 2005*). En el timo la ausencia de distintas Eph o ephrinas resulta en una severa hipocelularidad que afecta tanto a timocitos (*Munoz y cols., 2006; Alfaro y cols., 2008; Cejalvo y cols., 2013*) como a TECs (*García-Ceca y cols., 2013*). Otros autores han descrito, sin embargo, un número normal de células en los timos de ratones deficientes en EphB2 (*Coles y cols., 2004*) y en EphB6 (*Shimoyama y cols., 2002; Luo y cols., 2004*). Estos últimos autores, sin embargo, relacionaron precisamente la hipocelularidad con la sobre-expresión de EphB6 y señalaban que la ausencia de EphB6 comprometía las respuestas T *in vivo* e *in vitro*. Más recientemente, estos mismos autores describían que la delección específica de EphB4 en TECs no alteraba el desarrollo de los timocitos ni la reactividad inmune de las células T periféricas (*Jin y cols., 2014*). Algo similar sucedía cuando ephrina-B2 (*Jin y*

cols., 2012) o ephrina-B1 (Jin y cols., 2011) eran eliminadas en células T. Por el contrario, la doble delección de ephrina-B1/-B2 en timocitos afectaba tanto su número y funcionalidad como la estructura de la médula tímica (Luo y cols., 2011). En la mayoría de los estudios los autores justifican sus resultados en la creencia de que otras Ephs o ephrinas, en ausencia de las estudiadas “suplen su papel”. En apoyo de esta hipótesis, Kawano y colaboradores (Kawano y cols., 2012) han descrito que linfocitos derivados de ratones deficientes en EphB1, EphB2, EphB3 y EphB6, son aún capaces de responder a la estimulación por ephrina-B1 y ephrina-B2.

En la inmensa mayoría de los órganos la relación de Eph y ephrinas con la celularidad se ha asociado con su papel en el control de supervivencia/muerte y proliferación celular, pero en el caso del timo hay que considerar además que este órgano no contiene células madre con capacidad de auto-renovación (Zhang y Bhandoola, 2014) por lo que, al menos, el número de células linfoides depende de la colonización del órgano por progenitores que vienen del hígado fetal o de la médula ósea y su posterior maduración, lo que, lógicamente, también debe ser considerado a la hora de evaluar la baja celularidad de los timos deficientes en Eph o ephrinas.

En timos KO adultos para EphA4, el número de timocitos disminuye hasta 100 veces en correlación con el aumento del porcentaje de células DP apoptóticas (Munoz y cols., 2006). Algo similar se ha descrito en timos deficientes en EphB2 y/o EphB3, aunque en este caso, además de los timocitos DP, los DN también mostraban índices elevados de apoptosis. También timos con ephrinas-B1 y/o -B2 delecionadas específicamente en TECs o timocitos mostraban un aumento de la proporción de DNs apoptóticos y, a veces, de DP y SP, lo que resultaba de nuevo en un bajo contenido celular total (Cejalvo y cols., 2013).

Estudios *in vitro* han confirmado la relación entre la falta de señalización Eph/ephrina y muerte celular. *In vitro*, el bloqueo de las interacciones Eph/ephrinas-A, mediante las correspondientes proteínas de fusión solubles, produce en FTOCs un número reducido de células, particularmente timocitos DP que exhibían un aumento de apoptosis (Munoz y cols., 2002). En el mismo sentido, la estimulación de las EphA y el *crosslinking* de EphB6 y ephrina-B1 reduce la apoptosis mediada a través del TcR de timocitos murinos (Freywald y cols., 2003; 2006). Sin embargo, Luo y colaboradores (Luo y cols., 2001) han descrito que anticuerpos anti-EphB6 aumentan la apoptosis de células T en

presencia de dosis subóptimas de anticuerpos anti-CD3. No había indicación en este trabajo de la naturaleza activante o inhibidora de esos anticuerpos, en cualquier caso, es difícil comparar resultados entre sí porque los tipos celulares analizados y, sobre todo, los modelos experimentales son muy distintos.

Más difícil es establecer correlaciones entre los bajos niveles de celularidad observados en animales deficientes en Eph/ephrinas y los de proliferación linfoide. En timos EphA4-/- la hipocelularidad linfoide correlaciona con niveles de proliferación reducidos en todas las subpoblaciones de células T (*Munoz y cols., 2006*) y lo mismo pasaba en timos deficientes en EphB2 y/o EphB3, aunque aquí la reducción sólo afectaba a las células DN (*Alfaro y cols., 2008*). En otros casos, la interrupción *in vitro* de la señalización entre Eph y ephrinas-A, mediante proteínas de fusión solubles, no afectaba a la proliferación y en otros modelos experimentales, la hipocelularidad cursaba con un aumento del porcentaje de células DP en proliferación (*Cejalvo y cols., 2013*), lo que ha sido interpretado como un intento de recuperación de la celularidad (*Yu y cols., 2006*).

Los datos acerca de la celularidad epitelial tímica son mucho más escasos; algunos autores han apuntado, como antes indicábamos, que el número de TECs viene determinado por el de progenitores endodérmicos que organizan el primordio tímico temprano (*Jenkinson y cols., 2008*) y se ha descrito un aumento de la muerte de células epiteliales en el timo de ratones doble KO para Hoxa3/Pax (*Su y cols., 2001*), en el timo de ratones neonatos y adultos a los que les falta p63, un homólogo del supresor tumoral p53 (*Senoo y cols., 2007*), y en el de ratones adultos y fetales deficientes en EphB2 y/o EphB3 (*García-Ceca y cols., 2009a; 2013*). Además, la activación *in vitro* de las señales mediadas por Eph o ephrinas-B resulta en un rescate de la muerte de las TECs (*García-Ceca y cols., 2013*). El significado de este incremento de TECs apoptóticas no es conocido y, de hecho, la ausencia de moléculas (TGF β , Wnt) que afectan el microambiente epitelial tímico produciendo fenotipos muy parecidos a los de los ratones EphB2 y/o EphB3 KO no afecta la viabilidad epitelial (*Osada y cols., 2006; Hauri-Hohl y cols., 2008; Zuklys y cols., 2009*). En este trabajo sobre EphB y muerte epitelial se puso de manifiesto otro aspecto relevante para los objetivos de esta Tesis (ver luego). RTOCs establecidos sólo con TECs deficientes en EphB pero sin timocitos mostraban mayor número de TECs apoptóticas que los que aparecían en RTOCs

establecidos con TECs y timocitos, sugiriendo la relevancia de las interacciones timocito-TEC mediadas por EphB en la supervivencia epitelial (*Garcia-Ceca y cols., 2013*).

En cuanto a la proliferación del estroma tímico, tanto en timos embrionarios como en adultos deficientes en EphB, las proporciones de células en división dentro de la fracción CD45⁺ se reducía significativamente (*Garcia-Ceca y cols., 2009a*). Aunque los mecanismos implicados son desconocidos se ha descrito que factores conocidos por afectar la expansión epitelial (IGF-1, IGF-2, FGF7, FGF10) (*Jenkinson y cols., 2003; 2007*) son modulados por la actividad Eph/ephrinas (*Yokote y cols., 2005*).

Como señalábamos, las alteraciones en la migración de progenitores al timo fetal o adulto podrían afectar también su celularidad. Ensayos *in vitro* utilizando FTOCs colonizados por células Lin⁺ aisladas de médula ósea mostraban una significativa reducción de la celularidad en los lóbulos WT colonizados por progenitores deficientes en EphB2 o EphB3, pero no en aquellos que expresan una EphB2 truncada, EphB2LacZ, incapaces de transmitir señales *forward* pero no *reverse* (*Stimamiglio y cols., 2010; Mendes-da-Cruz y cols., 2012*). Más importante, todos los progenitores, tanto mutantes como WT, mostraban menor capacidad de colonización de los lóbulos deficientes en EphB, lo que ponía de manifiesto la importancia del microambiente tímico para la colonización de los progenitores. Estos resultados han sido confirmados recientemente en ensayos *in vivo* donde se observó una menor proporción de progenitores tímicos tempranos en timos deficientes en EphB (*Alfaro y cols., 2015*). Además, el número de células Lin⁺ derivadas de médula ósea de ratones mutantes, particularmente de EphB2^{-/-}, inyectadas intravenosamente que alcanzaban los timos WT era menor que el de células WT inyectadas. También, la colonización de progenitores Lin⁺ WT era menor en timos mutantes, particularmente, de nuevo, en timos EphB2^{-/-} (*Alfaro y cols., 2015*).

La importancia del microambiente tímico se confirmó al demostrarse la relación entre menor colonización y descenso en la producción en los timos mutantes de moléculas implicadas en la colonización tímica (*Zhang y Bhandoola, 2014*), como fibronectina y laminina, componentes de la matriz extracelular, y las quimiocinas CXCL12, CCL21 y CCL25. Además, la expresión de P-selectina, implicada en la migración de progenitores al timo adulto (*Gossens y cols., 2009*) se reducía significativamente en los endotelios

vasculares de timos deficientes en EphB2 o EphB3, pero no en aquellos que expresaban EphB2LacZ. También estos experimentos demuestran que el descenso de P-selectina en los timos EphB2^{-/-} correlacionaba con una menor expresión en los endotelios tímicos de ephrina-B1 y ephrina-B2, mientras que en los timos EphB3^{-/-} la reducción sólo afectaba a la ephrina-B1. Todos estos resultados sugerían que las señales *forward* mediadas a través del par EphB2/ephrina-B1 son particularmente importantes para la colonización linfoide del timo adulto (Alfaro y cols., 2015).

También se ha demostrado que la migración *in vitro* frente a gradientes de quimiocinas o moléculas de la matriz, como fibronectina o laminina, de progenitores linfoides y timocitos de ratones deficientes en EphB disminuye significativamente. De nuevo, la capacidad de migración era menor en células EphB2^{-/-} que en aquellas que expresaban EphB2LacZ; y, por otra parte, la estimulación de EphB2 en placas recubiertas con ephrina-B1Fc inhibía la migración sobre fibronectina o laminina y la quimiotaxis mediada por CXCL12, CCL21 o CCL25. Esta menor migración no se observaba con células EphB2LacZ que no transmiten señales *forward* (Stimamiglio y cols., 2010).

Todos estos resultados, por tanto, indican que en el caso de mutantes de EphB la hipocelularidad tímica se debe, en parte, a las alteraciones en la capacidad de colonización de los progenitores linfoides. En este sentido, es importante señalar que mientras otros mutantes con defectos en colonización debido a la falta de otras moléculas, como los receptores de quimiocinas CCR7 y CCR9, tras el déficit de colonización muestran una proliferación “compensatoria” de progenitores tempranos que recupera la celularidad tímica que no se da en los ratones deficientes en EphB2 o EphB3 (García-Ceca y cols., 2015).

5.2.3. Diferenciación T, Eph y ephrinas

Como se ha señalado, pocos son los trabajos que se han ocupado del papel de Eph/ephrinas en el timo, en todos ellos se ha prestado particular atención al componente linfoide, concluyéndose que mientras la hipocelularidad es un hecho común en todos los timos mutantes, en el caso de la diferenciación T el proceso parece ser mucho más específico de la molécula implicada, resultando en alteraciones específicas de subpoblaciones linfoides concretas.

In vitro el bloqueo de las interacciones Eph/ephrinas-A mediante tratamiento de FTOCs de rata con proteínas de fusión solubles afectaba la maduración de los timocitos inmaduros CD4⁺CD8⁺ (Munoz y cols., 2002). También FTOCs que crecen en presencia de ephrina-B1Fc muestran menos células DP junto con un aumento de los porcentajes de SP (CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺) (Yu y cols., 2006) y en reagregados (RTOC) formados con timocitos DP deficientes en EphB2 o EphB3 y TECs WT se demostraba que la progresión de timocitos DP a SP dependía autónomamente de la expresión de estas Eph en los timocitos (Alfaro y cols., 2011).

Los estudios *in vivo* han confirmado estos resultados y puesto de manifiesto las diferencias que ocurren en la diferenciación T cuando faltan unas u otras Eph/ephrinas. Mientras ratones adultos deficientes en EphA4 muestran un importante bloqueo en la diferenciación T con fuerte caída de la proporción de células DP (Munoz y cols., 2006), aquellos en los que faltan EphB2 y/o EphB3 sólo muestran mínimos cambios en las proporciones de las distintas subpoblaciones: un aumento en la proporción de células DN1 pero una caída en las células DN3, aunque en términos absolutos, hay una severa caída de timocitos a partir del estadio DN2 (Alfaro y cols., 2008). La deficiencia en otras EphB ha proporcionado resultados contradictorios; en el caso de EphB6, Shimoyama y colaboradores (Shimoyama y cols., 2002) no encontraron defectos en la diferenciación T, pero Luo y colaboradores (Luo y cols., 2004) describieron cambios en la función T en periferia en ausencia de la molécula y Coles y colaboradores (Coles y cols., 2004) apuntaron que la sobre-expresión de EphB2 bloqueaba el desarrollo en DN2-DN3. Los efectos sobre la diferenciación T también fueron escasos cuando se delecionaron las ephrinas-B1 y/o -B2 específicamente en timocitos o TEC (Cejalvo y cols., 2013). Cuando la delección acontecía en los timocitos había nuevamente un bloqueo parcial de la diferenciación T en el estadio DN3 (Jin y cols., 2011; Cejalvo y cols., 2013). La falta de ephrina-B1 y/o -B2 en TECs también afecta el desarrollo T siendo en este caso más importante la falta de ephrina-B2 (Cejalvo y cols., 2013), aunque Foster y colaboradores (Foster y cols., 2010) no encontraron fenotipo linfóide en el timo de ratones con el gen de la ephrina-B2 deleccionado condicionalmente en TECs productoras de IL7. Es importante aclarar que el *background* genético de los animales estudiados era importante para el fenotipo linfóide encontrado, algo ya descrito en el timo de ratones EphA4^{-/-} (Munoz y cols.,

2006). Timos con ephrina-B1 y/o -B2 delecionadas en timocitos mostraban un fenotipo más severo cuando se utilizaban ratones C57/B16-CD1 con un *background* mixto que en aquellos no híbridos C57/B16 (Cejalvo y cols., 2013).

La aparente relación entre defectos en Eph o ephrinas-B y baja proporción de células DN3, ha hecho proponer que quizás estas moléculas pudieran directa o indirectamente afectar algunos de los procesos que acontecen durante la maduración del compartimento DN, como la selección del TcR β o los efectos mediados por la señalización Notch o el par IL7/IL7R. En este sentido, Luo y colaboradores (Luo y cols., 2011) describieron un descenso de la expresión de IL7R α en timocitos doblemente delecionados en ephrina-B1 y -B2.

El hecho de que varias Eph y ephrinas-B distintas parezcan implicadas en la compleja maduración de los timocitos DN ha planteado, tanto en timo (Alfaro y cols., 2011) como en otros sistemas (Wilkinson, 2003; Pasquale, 2008), si más importante que la presencia/ausencia de ciertas Eph o ephrinas es el balance final de señales *forward* y *reverse* y las células en las que se producen (timocitos o TECs). Así, timos quiméricos generados con progenitores Lin⁻ de médula ósea de distintos tipos de mutantes (EphB2^{-/-}, EphB2LacZ, EphB3^{-/-}, EphB2/B3^{-/-}) inyectados en ratones SCID recuperaban en mayor o menor medida y, por tanto, de forma específica, la diferenciación T: quimeras establecidas con progenitores EphB2^{-/-} y dobles mutantes EphB2/B3^{-/-} mostraban un profundo bloqueo de la maduración T en el estadio DN, mientras que aquellos que recibían células EphB2LacZ generaban timocitos DP pero no SP y, finalmente, las quimeras generadas con células EphB3^{-/-} producían bajas proporciones de DP (Alfaro y cols., 2011). En cualquier circunstancia, estas quimeras mostraban fenotipos linfoides más severos que los observados en los ratones KO para EphB2 y/o EphB3 (Alfaro y cols., 2008) sugiriendo que el balance cualitativo y cuantitativo de señales Eph/ephrinas, que es evidentemente distinto en estos diferentes modelos experimentales, es el que, finalmente, determina los distintos fenotipos linfoides observados.

Aunque el número de estudios es muy escaso y frecuentemente los resultados son contradictorios, en términos generales ni las profundas alteraciones linfoides ni las epiteliales observadas en el timo de animales deficientes en distintas Eph y ephrinas han sido correlacionadas con alteraciones de las capacidades inmunológicas de los

mutantes. Jin y colaboradores (*Jin y cols., 2014*) no encontraron anomalías en la función de los linfocitos T maduros de ratones con una mutación condicional de EphB4 en TECs, mientras que este mismo grupo ha descrito alteraciones en la función T en ratones deficientes en EphB6 (*Luo y cols., 2004*). Más recientemente, Hu y colaboradores (*Hu y cols., 2015*) han descrito que la expresión de ephrina-B1 y -B2 es imprescindible para la producción de anticuerpos en un modelo murino de artritis inducida por colágeno y ratones doble KO para estas dos ephrinas-B en células T son menos susceptibles a encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), exhibiendo menor infiltración de células T en el sistema nervioso central, así como bloqueo de la quimiotaxis y de las respuestas proliferativas T específicas a mielina (*Luo y cols., 2016*). En timos EphA4^{-/-}, menor proporción de células DP TcR $\alpha\beta$ ^{hi}CD69^{hi} podría reflejar alteraciones en la selección $\alpha\beta$ (*Munoz y cols., 2006*), algo también observado en ratones con ephrina-B1 y/o -B2 delecionadas en TECs (*Cejalvo y cols., 2013*). Es importante indicar que tanto ratones KO para EphA4 (*Munoz y cols., 2006*), como deficientes en distintas EphB (*Alfaro y cols., 2008*), muestran números reducidos de células T periféricas pero con proporciones de las subpoblaciones CD4/CD8 normales. Además, un análisis del repertorio TcRV β expresado en timocitos y Ts periféricas solamente mostraba un aumento significativo de la proporción de CD4⁺V β 3⁺ en timo y ganglios linfáticos en los tres ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3 estudiados (*Munoz y cols., 2009*).

5.2.4. Alteraciones en el epitelio tímico debidas a deficiencias en Eph y/o ephrinas

Aunque nuevamente los datos son pocos, hay evidencia clara de un papel para Eph y ephrinas, sobre todo de la familia B, en la regulación del epitelio tímico de manera que la falta de algunas de estas moléculas afecta la organización tridimensional del epitelio tímico, esencial para la diferenciación T, resultando, entre otras alteraciones, en un aumento del número de quistes epiteliales (*Cejalvo y cols., 2015*), colapso epitelial (*Munoz y cols., 2006*) y aparición de áreas que no expresan marcadores epiteliales (*García-Ceca y cols., 2009a*).

En los ratones EphA4^{-/-} el epitelio cortical colapsa, quizás debido a la relación existente entre EphA4 y adhesión celular mediada por cadherinas (*Winning y cols.,*

2001). Estos timos como otros deficientes en otras Eph o ephrinas, particularmente de la familia B, contienen numerosas TECs inmaduras $K5^+K8^+$ y áreas que no expresan marcadores epiteliales, así como células medulares inmaduras $K5^+K8^+MTS10^+$ y abundantes células $K5^+K8^+MTS20^+$ (García-Ceca y cols., 2009a).

En otros mutantes, la alteración de la organización 3D epitelial resulta en un aumento del número de quistes epiteliales más que en la aparición de áreas carentes de marcadores epiteliales (Cejalvo y cols., 2015). La falta selectiva de ephrina-B1 y/o -B2 en TECs o timocitos resulta en un aumento del número de quistes epiteliales grandes, constituidos por una sola capa de células que son frecuentemente TECs inmaduras $K5^+K8^+$ y, a veces, $MTS20^+$. También aumenta el número de pequeños quistes con numerosas células maduras $UEA1^{hi}$ rodeadas de un delgado anillo de células $UEA1^{lo/-}MTS10^+$ (Cejalvo y cols., 2015). Además, estos ratones muestran alteraciones en la población epitelial cortical $Ly51^+$ (Cejalvo y cols., 2013). En timos con ephrina-B1 y -B2 delecionadas en timocitos o con la ephrina-B1 eliminada de las TECs, el epitelio cortical ha perdido su organización en empalizada y muestra grupos de células que expresan homogéneamente $Ly51$ haciendo difícil distinguir las células $Ly51^{hi}$ y $Ly51^{lo}$ observadas en timos WT. Así, datos inmunohistoquímicos previos indicaban que ya a 13.5F los timos $EphB2^{-/-}$ y/o $EphB3^{-/-}$ muestran alteraciones en la localización de las áreas $K5^+K8^+$, incipientes áreas carentes de marcadores epiteliales y retraso en la aparición de mTECs (García-Ceca y cols., 2009a). También se ha propuesto que ephrina-B1 es necesaria para la estratificación del epitelio luminal del esbozo tímico temprano y su posterior diferenciación a médula, mientras ephrina-B2 está implicada en el crecimiento longitudinal de las ramas epiteliales y ambas moléculas intervienen en la expansión y organización 3D de la red epitelial (Cejalvo, 2011).

5.2.5. Relevancia de las interacciones timocitos-TECs mediadas por Eph/ephrinas para la funcionalidad tímica

Ya señalábamos antes la relevancia de las interacciones timocitos-TECs para el correcto desarrollo de los dos compartimentos tímicos. Eph y ephrinas, como otras muchas familias de moléculas, median estas interacciones y algunos estudios en la literatura ejemplifican, aunque muchas veces de manera indirecta, su importancia para la función del timo.

De este modo, interacciones timocitos-TECs mediadas por Eph/ephrinas participaban en la supervivencia del epitelio tímico (*Garcia-Ceca y cols., 2013*) y en el control de la colonización linfóide de los timos fetales (*Stimamiglio y cols., 2010*) y adultos (*Alfaro y cols., 2015*). Por otro lado, el bloqueo de la diferenciación T con caída de la proporción de DP descrita en el timo de ratones EphA4-/- cursa, como antes indicábamos, con un profundo colapso del epitelio cortical y podría ser, por tanto, dependiente de la expresión de la molécula en el epitelio cortical, como sugiere la baja producción de timocitos DP en FTOCs mutantes injertados *in vivo* bajo la cápsula renal (*Munoz y cols., 2006*), pero lóbulos alinfoides tímicos deficientes en EphB colonizados por progenitores WT soportan una diferenciación normal en un proceso que habría de considerarse autónomo (*Garcia-Ceca y cols., 2009b*). También las profundas alteraciones observadas en los timos deficientes en EphB antes descritas han sido relacionadas con la ruptura de la organización epitelial debido a la imposibilidad de timocitos y TECs de entremezclarse e interactuar adecuadamente.

Aparentemente, por tanto, señales autónomas y no autónomas regulan los efectos de Eph/ephrinas-B sobre el desarrollo linfóide y epitelial tímico. La maduración epitelial es gobernada autónomamente por EphB2 y EphB3 expresadas en TECs, pero las EphB expresadas por los timocitos ejercen cierto papel no autónomo, porque el fenotipo epitelial de lóbulos tímicos mutantes colonizados *in vivo* por progenitores WT no es exactamente igual que el encontrado en los timos deficientes en EphB (*Garcia-Ceca y cols., 2009b*), y timos SCID que reciben progenitores deficientes en EphB muestran un epitelio tímico alterado (*Alfaro y cols., 2011*).

In vitro, RTOCs establecidos con TEC fetales y timocitos DP, que reciben ephrina-B1Fc, desorganizan la red epitelial, previenen las interacciones timocito-TEC y alteran la señalización del TcR (*Alfaro y cols., 2007*). También el número y momento de la formación de conjugados entre timocitos y TECs cambia cuando se establecen con timocitos DP deficientes en EphB (*Alfaro y cols., 2011*).

Finalmente, antes hemos significado la importancia capital de la migración de los timocitos en desarrollo por los distintos territorios tímicos para alcanzar su plena capacitación funcional, cuando se analiza durante 20 horas el posicionamiento de progenitores Lin⁻ de médula ósea WT o deficientes en EphB, en FTOCs reconstituidos, se observa que sólo un pequeño número de estos últimos alcanzaba el centro de los

lóbulos (*Stimamiglio y cols., 2010*). Además, timocitos totales EphB2^{-/-} migran peor sobre laminina o fibronectina o en respuesta a quimiocinas que los WT. Cuando las señales *forward* mediadas por EphB2 eran activadas con proteínas de fusión ephrina-B1Fc había una significativa reducción de la migración de todas las subpoblaciones de timocitos WT pero no de los EphB2LacZ, indicando que la migración de los timocitos en desarrollo por el estroma tímico podría ser regulada inhibiendo la señalización *forward* a través de EphB2 y, en general, modulando negativamente las interacciones EphB2-ephrinas-B (*Stimamiglio y cols., 2010*).



OBJETIVOS

Pretendemos en este trabajo una mejor caracterización de los fenotipos tímicos observados en ratones deficientes en EphB2 o EphB3, estudiando los posibles mecanismos que explican su aparición y las células y/o moléculas responsables de dichos fenotipos profundizando, por tanto, en nuestros estudios anteriores sobre el timo de estos mutantes. Incorporamos, además, el análisis del timo de ratones EphB2LacZ que nos proporciona información sobre la importancia de las señales *forward* y *reverse* mediadas por EphB2 en la biología del timo. Por otro lado, estos estudios nos ayudarán a un mejor conocimiento del desarrollo del órgano, de la importancia de las relaciones entre timocitos y células epiteliales y de la maduración de los compartimentos histológicos del órgano y de los distintos tipos de TECs. Para ello, estudiaremos cuatro elementos distintivos de los timos deficientes en EphB2 o EphB3:

- 1) La baja celularidad linfoide y epitelial del timo hasta ahora no cuantificada y sólo reseñada en base al pequeño tamaño del órgano.
- 2) Las alteraciones en la aparición y maduración de los distintos tipos de TECs que culminan en la profunda alteración del epitelio tímico adulto.
- 3) La relevancia de las interacciones y tipo de señalización entre timocitos-TECs mediadas por EphB2 o EphB3 para entender el fenotipo epitelial de los mutantes.
- 4) La especificidad de dichos fenotipos que se refleja en la distinta morfología y desarrollo del epitelio tímico deficiente en EphB2 o EphB3.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. RATONES

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado ratones (*Mus musculus* L.) *wild type* (WT) y deficientes en los receptores EphB2 (EphB2^{-/-}) o EphB3 (EphB3^{-/-}). La elección de los mutantes utilizados no es fortuita. Aun disponiendo de otros mutantes de EphB en nuestro *stock* de animales y, particularmente, del doble mutante EphB2/EphB3 hemos elegido el estudio de los ratones deficientes en EphB2 o EphB3 porque su fenotipo tímico es, a tenor de nuestros resultados previos, claramente diferenciable, específico, y, aparentemente, más severo en ausencia de EphB2. Por el contrario, el fenotipo del doble mutante, aunque ligeramente distinto de los de EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, no añade excesiva información adicional a la proporcionada por esos ratones (García-Ceca y cols., 2009).

Además, se emplearon ratones EphB2LacZ cuyas células expresaban una molécula EphB2 cuyo dominio citoplásmico ha sido sustituido por el gen de la β -galactosidasa. El estudio de estos ratones permite distinguir la importancia de las señales *forward* y *reverse* mediadas por EphB2 en los procesos estudiados.

Los diferentes mutantes, generados en *background* genético CD1, fueron cedidos por el Dr. Mark Henkemeyer (Southwestern Medical Center, Dallas, Texas), mientras WT de la cepa CD1 fueron adquiridos a Harlan Ibérica (España) y utilizados como controles y para el mantenimiento de las colonias WT y mutante, cuando fue necesario “refrescar” su *background*. Por otro lado, el mantenimiento de la colonia mutante, se realizó cruzando hembras y machos homocigotos para la mutación. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense (UCM).

Los ratones deficientes en el receptor EphB2 fueron generados por recombinación homóloga en células troncales embrionarias, donde se produjo una delección de un fragmento de 1.4Kb del segmento 5' del *locus* EphB2, insertando en su lugar una construcción génica de resistencia a neomicina. Esta delección provoca la eliminación del segmento que codifica los aminoácidos 29-50 de la molécula, lo que resulta en un *splicing* aberrante del ARNm que bloquea totalmente la expresión de la proteína funcional (Henkemeyer y cols., 1996). Los ratones EphB3^{-/-} se obtuvieron inactivando el gen mediante recombinación homóloga, de nuevo, en células troncales

embrionarias insertando una construcción génica de resistencia a neomicina que, en este caso, reemplazaba la mayoría del segmento génico que codifica el dominio quinasa de la molécula. El transcrito generado de esta construcción origina un ARNm inestable que no se traducía a proteína (Orioli y cols., 1996). Por último, los ratones EphB2LacZ fueron diseñados para expresar una proteína híbrida, compuesta por los dominios extracelular, transmembrana y juxtamembrana de EphB2 (aminoácidos 1-621) unidos a β -galactosidasa en lugar del dominio citoplásmico. Esta molécula carece totalmente de los dominios catalíticos tirosina quinasa y carboxilo terminal del dominio citoplásmico de la molécula EphB2 (Henkemeyer y cols., 1996), por lo que no puede transmitir una señal *forward* al interior celular, pero si transmitir señal *reverse* en las células que expresan el ligando.

Los ratones deficientes en los receptores EphB2 y EphB3 y los ratones EphB2LacZ son viables, fértiles y sin defectos anatómicos, aunque algunos individuos EphB2/- muestran un comportamiento que les hace correr en círculos sobre sí mismos (Henkemeyer y cols., 1996).

En nuestro estudio se emplearon fetos de 12.5, 13.5, 14.5, 15.5, 17.5 días post-coito (F), animales postnatales (7PN) y de 1-2 meses de edad, tanto WT como deficientes en los receptores EphB2, EphB3 y EphB2LacZ. Las hembras y machos fueron puestos a aparear durante un periodo nocturno de doce horas, considerando día 0.5 de gestación el día de detección del tapón vaginal. El día del nacimiento se estableció como día 0.

1.1. Genotipado de los animales en estudio

Una vez obtenidos los animales se determinó su genotipo para asegurar la naturaleza de sus defectos. Para ello, se aisló ADN y se detectaron los alelos WT y mutante para EphB2, EphB3 o EphB2LacZ dependiendo de que ratones se tratase. Los protocolos utilizados se indican a continuación.

1.1.1. Aislamiento ADN

El ADN se extrajo de fragmentos de colas de ratones fetales o postnatales, que fueron sumergidos en 500 μ l de tampón de extracción de ADN (Anexo I) + Proteinasa K (0.1mg/mL) (Roche, Alemania) incubándose a 60°C durante toda la noche. Las

muestras fueron después disgregadas completamente mediante agitación, agregándoles a continuación acetato potásico (Anexo I) en tampón de extracción (1:3), agitadas hasta conseguir la homogeneización de ambas soluciones y, posteriormente, centrifugadas a 10.000 r.p.m. durante 10 min., transfiriendo el sobrenadante a tubos Eppendorf estériles.

La precipitación del ADN se realizó incorporando 0.8 volúmenes de isopropanol (Panreac S.A., Barcelona, España) por volumen de sobrenadante recuperado. A continuación, los tubos fueron agitados suavemente hasta alcanzar la total homogeneización de ambas soluciones y la precipitación del ADN. Acto seguido, las muestras se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 min., eliminándose posteriormente el sobrenadante. El *pellet* de ADN se centrifugó de nuevo a 13.000 r.p.m. durante 5 min. para descartar completamente los restos de sobrenadante y, a continuación, se secó al aire a temperatura ambiente (TA) evitando en todo momento que se secase en exceso. Finalmente, el ADN fue hidratado con agua Milli-Q estéril, durante un par de horas a TA o durante toda la noche a 4°C, procediéndose después a su cuantificación mediante un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, EEUU).

1.1.2. PCR e identificación de los alelos WT y mutantes

Un vez obtenido el ADN, se analizó la presencia de alelos WT y mutantes para las moléculas Eph estudiadas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo los protocolos proporcionados por el Dr. Mark Henkemeyer (comunicación personal) mostrados en el Anexo II. Los oligonucleótidos empleados como *primers* en esta reacción (Tabla 1, Anexo II) fueron sintetizados por Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd, Cambridgeshire, Reino Unido). Las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania; o, BioRaD, EEUU) empleando Taq (*Thermus sp*) DNA polimerasa recombinante (Biotools, Madrid, España), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos resultantes de la reacción de PCR se mezclaron con tampón de carga (Anexo I), se resolvieron en geles de agarosa (Biotools, Madrid, España) al 1-2% diluida en TAE 1x (Anexo I) y se revelaron con bromuro de etidio. Posteriormente, los geles fueron visualizados y

adquiridas las imágenes correspondientes en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-RAD, Barcelona, España) con el programa informático Quantity One.

2. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES, OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

El sacrificio de los ratones se hizo por dislocamiento cervical en el caso de ratones adultos y hembras gestantes, y por hipotermia en los neonatales. Posteriormente, se procedió a la disección del animal para la extracción de las muestras (feto, timo o riñón), que eran procesadas o congeladas. Los lóbulos tímicos y el hígado de los ratones fetales fueron obtenidos a diferentes días de desarrollo (12.5F-17.5F), tras su extracción del útero materno se depositaban en placas Petri con PBS 1x frío sobre hielo. Posteriormente, se retiraba la cabeza del feto en aquellos que iban a ser usados para la extracción de los lóbulos tímicos o del hígado; mientras que los que iban a ser congelados para estudios histológicos se dejaban intactos, excepto los lóbulos tímicos de 17.5F y 7PN que eran extraídos directamente para su congelación. Todo este proceso se realizaba bajo condiciones de esterilidad cuando los órganos o células iban a ser usados para cultivo.

En el caso de los estudios histológicos tanto los fetos (12.5F-15.5F) como los lóbulos tímicos de estadios posteriores (17.5F y 7PN) y los reagregados celulares (RTOCs), eran sumergidos en medio crioprotector OCT Tissue-Tek (Miles Laboratories, EEUU) e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido, conservándose a -80°C hasta su posterior uso.

3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES

3.1. Suspensiones de lóbulos tímicos fetales de 12.5-17.5 días de desarrollo fetal

Los lóbulos tímicos fetales fueron recogidos en medio RPMI 1640 y tratados individualmente o en *pool* según la finalidad del estudio. A continuación, el medio era retirado y los lóbulos disgregados con tripsina al 0.25% (Thermo Scientific, EEUU) y DNAsa I 0.1mg/mL (Roche, Alemania) en RPMI 1640 durante 15-20 min. a 37°C y

agitación con pipeta, excepto para el análisis de la expresión de las claudinas 3,4 que se realizaba con colagenasa 1.2mg/mL (Roche, Alemania), ya que la tripsina desnaturalizaba los epítomos reconocidos por los anticuerpos. Una vez obtenida una suspensión celular homogénea, la actividad enzimática de la tripsina se bloqueaba con medio RPMI 1640 frío al 2% de suero bovino fetal (FBS; Thermo Scientific, EEUU) previamente descomplementado (56°C, 30 min.) y 10mM de EDTA (Panreac, España), para evitar agregados celulares. A continuación, las suspensiones eran centrifugadas a 4°C, a 1500 r.p.m. durante 5 min., el sobrenadante eliminado y el *pellet* celular resultante resuspendido en RPMI 1640 al 2% de FBS con 10mM de EDTA. Posteriormente, se procedía al recuento celular mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer), excluyendo del conteo las células muertas.

En el estudio de las subpoblaciones de timocitos DN de fetos de 12.5F-14.5F una vez aislados los lóbulos tímicos, su homogenización se realizaba en medio RPMI 1640 al 2% FBS empleando un homogeneizador de plástico tipo Potter, sin tripsina que escindía los epítomos de las moléculas que definen las subpoblaciones de DN.

En todos los casos, una vez obtenida la suspensión celular era filtrada haciéndola pasar a través de una malla de nylon de 100µm, previamente humedecida con el medio en el que se resuspendían las células en cada condición experimental, para asegurar la completa eliminación de cualquier agregado y resto celular.

3.2. Suspensiones de hígado fetal procedentes de fetos de 12.5 días de desarrollo fetal

Los hígados fetales se recogían individualmente en medio RPMI 1640 y se disgregaban mecánicamente con la ayuda de una pipeta Pasteur. A continuación, la suspensión celular resultante se filtraba a través de un algodón no graso humedecido con el mismo medio en el que se llevaba a cabo la suspensión y se centrifugaba a 4°C a 1500 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente, el sobrenadante era retirado y el *pellet* celular resuspendido en 500µL de tampón de lisis, para eliminar los eritrocitos (Anexo I), durante 10 min. en hielo. La acción del tampón era detenida incorporando PBS 1x y la muestra, de nuevo, centrifugada. A continuación, el *pellet* celular era resuspendido en medio RPMI 1640 al 2% de FBS para su recuento mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer), excluyendo las células muertas.

3.3. Suspensiones celulares enriquecidas en TECs procedentes de timos postnatales de 7 días o de lóbulos tímicos implantados bajo la cápsula renal

El enriquecimiento en TECs a partir de timos de 7PN, de lóbulos tímicos deplecionados de timocitos o de RTOCs recuperados tras trasplante bajo la cápsula renal (ver más adelante) fue realizado modificando el protocolo de Seach y colaboradores (*Seach y cols., 2013*). Los lóbulos tímicos fueron depositados en medio RPMI 1640 frío y a continuación, limpiados del tejido conectivo y adiposo circundante y cortados superficialmente sin fragmentar el tejido mediante el empleo de una tijera de disección. Posteriormente, los lóbulos eran transferidos a un tubo cónico con 2-5mL de RPMI 1640 frío y con la ayuda de una pipeta Pasteur, cortada según el tamaño del tejido a digerir, se agitaba el medio para eliminar el mayor número posible de timocitos, evitando una excesiva fragmentación del tejido. Cuando el medio estaba turbio por la liberación de los timocitos, era retirado y renovado. Cuando la liberación de timocitos de los fragmentos era escasa se dejaban decantar los fragmentos tímicos en hielo y, a continuación, el medio era retirado por completo y los fragmentos incubados con Liberasa TM (Roche, Alemania) a 1U/mL y DNAsa I a 0.1mg/mL (Roche, Alemania), durante 15 min. a 37°C. Transcurrido este tiempo, los fragmentos tímicos eran completamente disgregados mediante agitación mecánica con la ayuda de una pipeta Pasteur hasta conseguir una suspensión celular lo más homogénea posible (sin observar fragmentos ni agregados celulares). Cuando hacía falta una segunda incubación, los fragmentos eran nuevamente decantados y el medio transferido a un tubo cónico limpio que se conservaba en hielo junto con FACS buffer (Anexo I) para inactivar la acción enzimática de la liberasa. Tras la segunda incubación, todas las fracciones tratadas con la liberasa se juntaban y filtraban a través de una malla de nylon de 100µm. Esta suspensión era centrifugada a 4°C durante 5 min. a 1500 r.p.m. y el *pellet* resultante era resuspendido, de nuevo, en FACS buffer procediendo a continuación al recuento celular mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer), excluyendo las células muertas.

En algunos casos, la fracción de medio retirada antes de la adición de liberasa era utilizada para analizar la proporción, mediante citometría de flujo (ver a continuación), de las diferentes subpoblaciones de timocitos en base a la expresión de los marcadores

CD4 y CD8, y conocer la diferenciación de estas células. Aunque la fracción digerida con liberasa también contenía timocitos, la digestión con esta enzima escindía los epítomos de esos marcadores por lo que no se podía usar para identificarlos.

3.4. Enriquecimiento en células epiteliales *nurse* procedentes de timos adultos

La obtención de células *nurse* fue realizado de acuerdo al protocolo de Wekerle y colaboradores (*Wekerle y cols., 1980*). Inicialmente, los lóbulos tímicos procedentes de un mínimo de tres ratones de 1 mes de edad eran recogidos en una placa Petri con PBS 1x frío. A continuación, los timos eran limpiados del tejido conectivo y adiposo circundante y transferidos a un vaso de precipitado pequeño que contenía 5-10mL de PBS 1x frío, donde se cortaban hasta obtener fragmentos de un tamaño aproximado menor a 1 mm, reemplazando el PBS por nuevo cuando aumentaba la turbidez por la liberación de los timocitos. Una vez obtenidos los fragmentos de 1mm, el PBS era retirado y añadido 10mL de PBS 1x frío nuevo. Los fragmentos resultantes eran agitados magnéticamente en hielo durante 10 min. a 500 r.p.m. para favorecer la salida de los timocitos. Transcurrido este tiempo, los fragmentos se dejaban decantar, el PBS era retirado y se volvía a repetir el proceso. Tras esta segunda agitación, los fragmentos se dejaban decantar nuevamente, el PBS se retiraba y se añadían 10mL de tripsina 0.25x + 0.1mg/mL de DNAsa I precalentada a 37°C. Los fragmentos tímicos eran incubados en agitación a 37°C durante 10 min., para favorecer la disgregación del tejido. Tras la digestión de todos los fragmentos, la suspensión celular era transferida a un tubo cónico y la acción de la tripsina era neutralizada con la incorporación de otros 10mL de RPMI 1640 con 2% FBS frío. Esta suspensión era filtrada a través de una malla de nylon de 100µm de poro y centrifugada a 4°C a 1500 r.p.m. durante 5 min. El *pellet* resultante era resuspendido en medio RPMI 1640 con 2% FBS frío procediendo a continuación al recuento celular mediante un hemocitómetro. A partir de este punto, se preparaba una alícuota de 150×10^6 células totales que era centrifugada y el *pellet* obtenido era resuspendido en 3mL de RPMI 1640. A continuación, se pasaba por tres gradientes de densidad al 50% de FBS en PBS: el primero de 10mL, el segundo de 4mL y el último de 2mL. En el primero de los gradientes, 3mL de la suspensión original eran depositados sobre los 10mL de FBS al 50% contenidos en un tubo cónico de 50mL y dejados decantar a TA durante 30-40 min. Durante este tiempo, se podía observar la

decantación de las células más densas contenidas en los 3mL iniciales. Trascurrido el tiempo, se recogían con una pipeta Pasteur 6mL desde la parte inferior del tubo, con cuidado de no desorganizar las distintas fases que se habían formado durante el proceso de decantación. Los 6mL recuperados eran nuevamente centrifugados durante 5 min. y el *pellet* resuspendido en 700µL de RPMI 1640, contándose el número total de células recuperadas y de células *nurse* en el caso de observarse. Estas células eran identificadas por su gran tamaño y por la presencia de timocitos en su interior. A continuación, los 700µL eran cargados en el segundo gradiente y se dejaban decantar durante 20 min. Trascurrido el tiempo, se recogían 2.5mL como en el primer gradiente y se centrifugaban durante 5 min. El *pellet* resultante era resuspendido en 500µL de RPMI realizando el recuento total de células recuperadas y de células *nurse*. Por último, los 500 µL eran cargados en el tercer gradiente y se dejaban decantar 20 min., recuperándose 1mL del fondo del gradiente, que era nuevamente centrifugado y el *pellet* resuspendido en 100µL de RPMI 1640. Por último, se realizaba el recuento de células recuperadas totales y de células *nurse*, que en este último gradiente era proporcionalmente mayor.

Para el análisis fenotípico de las células *nurse* y para la determinación del número de timocitos que estas contenían, después del tercer gradiente, los 100µL finales eran citocentrifugados durante 5 min. a 300 r.p.m. El portaobjetos se dejaba secar a temperatura ambiente y, seguidamente las muestras eran fijadas en acetona durante 10 min., y preservadas en ambiente seco a -80°C hasta su tinción por inmunofluorescencia (ver más adelante).

4. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

4.1. Análisis fenotípico de las diferentes subpoblaciones celulares

La determinación de marcadores de superficie, que específicamente definen distintas subpoblaciones celulares, obtenidas como se ha descrito en el apartado 3, se realizó empleando un número de células que oscilaba entre 0.1×10^5 - 0.4×10^6 dependiendo del estadio de desarrollo y del tipo de lóbulos tímicos u órganos empleados. Las células fueron incubadas a 4°C durante 15 min. en PBS 1% FBS con concentraciones saturantes de los anticuerpos conjugados directamente al fluorocromo, purificados o

biotinilados (Tabla 1, Anexo III) necesarios en cada tipo de ensayo. Tras el tiempo de incubación las células eran lavadas para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, con PBS al 1% FBS durante 5 min. a 1500 r.p.m. y, a continuación, resuspendidas en un volumen apropiado de PBS al 1% FBS dependiendo del número de células que contuviera la muestra. En el caso de los anticuerpos purificados, su detección se realizó utilizando anticuerpos secundarios (Tabla 1, Anexo III) que específicamente reconocían el tipo de inmunoglobulina empleada como anticuerpo primario. Para ello, las suspensiones celulares fueron incubadas nuevamente a 4°C durante 15 min. en oscuridad, lavadas y resuspendidas en PBS al 1% de FBS para su posterior análisis. Los anticuerpos biotinilados fueron identificados utilizando estreptavidina o *anti-Biotin Microbeads* (Tabla 1, Anexo III) resuspendidos en PBS sin suero e incubados en oscuridad a 4°C durante 15 min. Posteriormente, las células fueron lavadas y resuspendidas como anteriormente se ha indicado.

Para la detección del marcador intracelular ($\beta 5t$) en combinación con la de marcadores de superficie, se procedió inicialmente como se ha descrito para la identificación de las moléculas de superficie celular. Posteriormente, las células eran incubadas con la solución *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences, EEUU) a 4°C durante 20 min. en oscuridad, a continuación, lavadas dos veces con *PermWash* 1x (BD Biosciences, EEUU) e incubadas en oscuridad con el anticuerpo que reconocía el antígeno intracelular diluido en *PermWash*, para mantener la permeabilización de la membrana celular, a 4°C durante 30 min. Finalmente, el anticuerpo primario se puso de manifiesto tras una segunda incubación con un anticuerpo secundario (Tabla 1, Anexo III) tal y como se ha descrito previamente.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, EEUU) cuando se analizaban cuatro marcadores o bien en un FACS Aria (BD Biosciences, EEUU), cuando se analizaban más de 4, del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM o en un FACSCanto (BD Biosciences, EEUU) en aquellos ensayos realizados en la Universidad de Monash (Australia). El número de TECs adquiridas osciló entre 0.1×10^4 y 1×10^4 dependiendo de su procedencia; mientras que en el caso del estudio de timocitos se adquirieron entre 0.1×10^4 y 2×10^4 células dependiendo del estadio de desarrollo estudiado. En todos los casos, las células muertas fueron excluidas del análisis de acuerdo con los parámetros de tamaño (FSC) y

complejidad (SSC). Todos los datos obtenidos desde los equipos FACSCalibur y FACS Aria fueron analizados con el programa informático FCS Express III (De Novo Software, Los Angeles, EEUU), mientras que los datos obtenidos con el equipo FACSCanto fueron analizados con el programa FlowLogic (Inivai Technologies, Australia).

4.2. Determinación de la viabilidad celular

La determinación de células apoptóticas en timos de 12.5F y 13.5F fue calculada mediante un ensayo de unión a AnexinaV. Para ello, las suspensiones celulares (0.1×10^5 - 0.5×10^5 células) fueron lavadas con tampón de Anexina (Anexo I) al 1% FBS, e incubadas durante 20 min. a temperatura ambiente con una solución que contenía AnexinaV (Biolegend, San Diego, CA, EEUU) y los anticuerpos (anti-EpCAM y anti-CD45) directamente conjugados a un fluorocromo, necesarios para la determinación de las subpoblaciones celulares apoptóticas. Posteriormente, se lavaron y se procedió a su análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, EEUU) del Centro de Citometría y Microscopia de Fluorescencia de la UCM. Diez minutos antes del análisis, las células eran resuspendidas en una solución que contenía PBS al 1% FBS junto con 1mg/mL de 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU). Se consideraron células apoptóticas las AnexinaV positivas, 7-AAD negativas (AnexinaV⁺/7-AAD⁻). En las diferentes muestras, el número de células analizadas osciló entre 0.1×10^4 y 1×10^4 dependiendo del estadio. Los restos celulares fueron de nuevo excluidos del análisis de acuerdo con los parámetros de tamaño y complejidad.

4.3. Determinación de las células en proliferación

El estudio de la proporción de células en división se realizó mediante la cuantificación del contenido de ADN usando el reactivo Hoechst 33342 (Molecular Probes, Oregon, EEUU), que permite la identificación de la etapa del ciclo celular en la que se encuentra una célula, debido a su capacidad de unión al ADN, pudiendo identificar así células en fase G₁, S o G₂/M. Las células en división corresponden a las células en fase S+G₂/M. Las suspensiones celulares obtenidas según lo indicado en el punto 3.1 que contenían entre 2×10^4 - 0.4×10^6 células procedentes de lóbulos tímicos de diferentes días de desarrollo (12.5F-15.5F y 17.5F) fueron incubadas a 37°C durante 90 min. en agitación

con una solución HSB (*Hoechst staining buffer*)(Anexo I) que contenía 5µg/mL de Hoechst 33342. A continuación, las muestras eran incubadas con los anticuerpos anti-EpCAM, anti-MTS20, anti-Ly51, UEA1 y anti-CD45 diluidas en HSB tal y como se indica en el apartado 4.1. Finalizado el marcaje, las células eran mantenidas en hielo y resuspendidas en un volumen óptimo (200-300µL) del HSB, para ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences, EEUU) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM. En todos los casos, el número de células analizado osciló entre 0.1×10^4 y 1×10^4 dependiendo del estadio, excluyendo del análisis, por un lado, las células muertas de acuerdo con los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) y por otro, los dobletes celulares. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa informático FCS Express III (De Novo Software, Los Angeles, EEUU).

4.4. Análisis de la expresión de Eph y ephrinas

Para determinar la expresión de los receptores EphB2, EphB3 y de sus ligandos, ephrina-B1 y ephrina-B2, en las células epiteliales tímicas y en los timocitos, se obtuvieron suspensiones celulares que contenían entre 0.5×10^5 - 1×10^5 células procedentes de lóbulos tímicos de diferentes días de desarrollo (12.5F-15.5F), según lo indicado en el apartado 3.1. Previo al marcaje con los anticuerpos específicos, las células fueron fijadas con una solución de formaldehído al 2% durante 5 min. a TA. Transcurrido este tiempo, se inactivaba la acción del fijador con PBS 1x y se lavaban las células; a continuación, eran incubadas con los anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 o anti-ephрина-B1 o anti-ephрина-B2, anti-Ly51, UEA1, anti-EpCAM y anti-CD45 (Tabla 1, Anexo III), según lo descrito en el apartado 4.1. Los anticuerpos anti-EphB y anti-ephрина-B y UEA1 fueron identificados realizando una segunda tinción como se ha indicado anteriormente. Finalizado el marcaje, las muestras eran fijadas con CellFix 1x (BD Biosciences, EEUU) y conservadas a 4°C en oscuridad hasta su análisis en un citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences, EEUU) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM. En todos los casos, el número de células analizadas osciló entre 0.1×10^4 y 1×10^4 dependiendo del estadio. Los datos obtenidos fueron analizados como en el apartado anterior. El cálculo del porcentaje de expresión de estas moléculas se realizó interpolando los perfiles de expresión de cada una en las

diferentes subpoblaciones analizadas con los de aquellos obtenidos empleando un control FMO (*Fluorescence Minus One*). En este control no se incorporaba el anticuerpo primario que detectaba la molécula de interés (EphB o ephrina-B), pero sí el resto de marcadores empleados en el marcaje. El programa calculaba un porcentaje de positividad que representamos como el valor de expresión de cada molécula estudiada.

5. AISLAMIENTOS CELULARES

5.1. Aislamientos mediante *sorting*

Suspensiones celulares de lóbulos tímicos de 15.5F (9-13 fetos) o 7PN (entre 2-3 timos) para análisis de la expresión génica (ver más adelante) y de fetos de 12.5F (18-52 fetos, procedentes de entre 2-5 camadas) para testar el potencial de diferenciación de diferentes subpoblaciones TECs, fueron obtenidas según se ha descrito en el apartado 3.1.

- Para el aislamiento de las diferentes subpoblaciones de 12.5F, las muestras fueron incubadas dependiendo del procedimiento experimental a realizar con anticuerpos específicos frente a EpCAM, CD45, MTS20, Ly51 y UEA1 (Tabla 1, Anexo III), tal y como se ha descrito anteriormente (Apartado 4.1). Por un lado, se aislaron las subpoblaciones celulares tímicas principales: timocitos $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^+$ (CD45^+) y células epiteliales totales ($\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$). En otros casos, se aislaron diferentes subpoblaciones de TECs en base a la expresión de MTS20 ($\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+$) o de MTS20, Ly51 y UEA1 ($\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$, $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ y $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$). Estas suspensiones celulares fueron aisladas empleando un citómetro separador Influx I (BD Biosciences, EEUU) del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) o del FlowCore (Monash University, Australia) con las siguientes condiciones de tamaño de poro y presión: 100 μm y 20 psi, respectivamente. Antes del aislamiento, las células se pasaban por un filtro con un tamaño de poro de 50 μm (BD Biosciences, EEUU) y tiñéndose con DAPI o 7-AAD con el fin de descartar las células muertas. Las células aisladas eran recogidas en condiciones de esterilidad en tubos Eppendorf con 500 μl

de medio RPMI al 30% de FBS, cuya superficie interna se impregnaba con FBS puro, a fin de perder el menor número de células posibles.

- En el caso de suspensiones celulares obtenidas a partir de timos de 15.5F y 7PN teñidas únicamente con anticuerpos anti-EpCAM y anti-CD45, para aislar la población epitelial total (EpCAM⁺CD45⁻) o mesenquimal (EpCAM⁻CD45⁻), se usó un citómetro separador FACSaria (BD Biosciences, EEUU) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM con: tamaño de poro de 85µm y presión de 45psi. Las células, que serían usadas posteriormente en ensayos de expresión génica (ver más adelante), eran recogidas en un tubo de fondo cónico de 15 mL que contenía 5 mL de RPMI al 30% de FBS.

5.2. Aislamiento de estroma tímico (CD45⁻) mediante selección magnética

Para el aislamiento de lóbulos tímicos procedentes de ratones de 12.5F-15.5F (descrito en el apartado 3.1), se emplearon fetos procedentes de una misma camada (8-13 fetos), considerada como un experimento independiente. Una vez calculado el número de células, éstas eran incubadas con el anticuerpo primario anti-CD45 biotinilado y secundario *anti-Biotin MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Alemania) como se ha descrito en el apartado 4.1. Las células CD45⁻ fueron aisladas empleando un separador magnético AutoMACS (Miltenyi Biotec, Alemania) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM, usando el programa Deplete_S según las indicaciones del fabricante. La pureza de la fracción recuperada (CD45⁻) era comprobada tiñendo una alícuota de la suspensión con un anticuerpo anti-CD45^{PerCP}. En todos los casos el aislamiento había de tener una pureza de entre el 97-99%. Cuando no había disponible un citómetro de cuatro colores, esta fracción nos permitía realizar la identificación posterior de diferentes subpoblaciones epiteliales mediante la combinación de anticuerpos anti-EpCAM, anti-MTS20, anti-Ly51 y UEA1.

6. CULTIVOS CELULARES

6.1. Enriquecimiento de fibroblastos murinos embrionarios

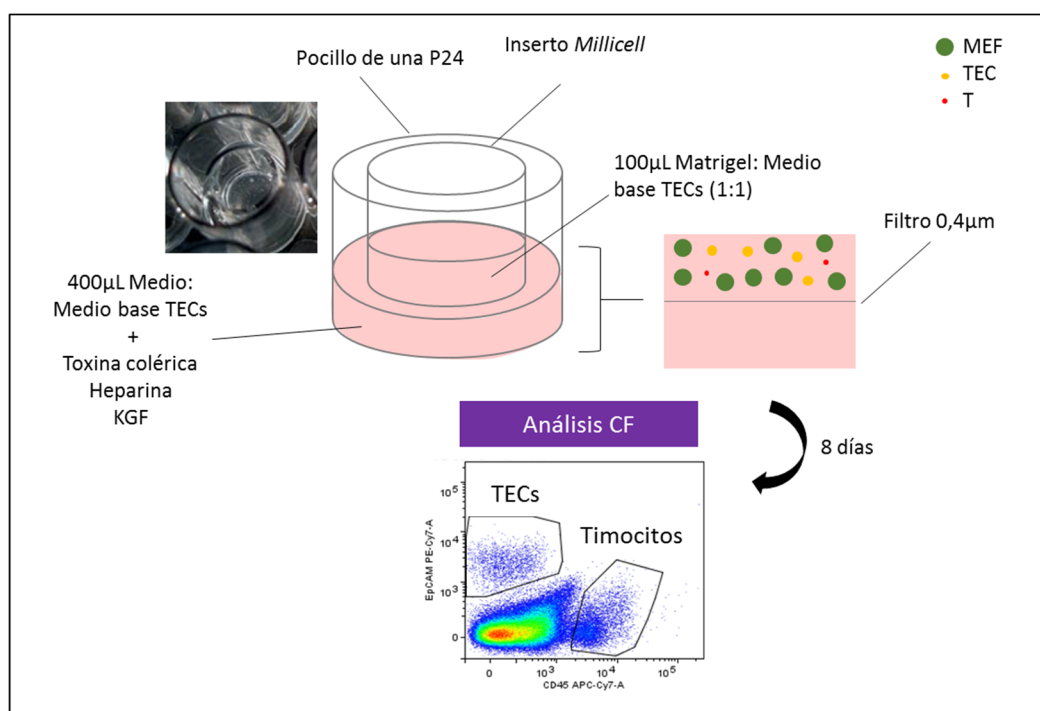
Los fibroblastos murinos embrionarios (MEF) fueron extraídos en condiciones de esterilidad de fetos WT de 12.5F o 14.5F modificando el protocolo desarrollado por

Bennett y colaboradores (*Bennett y cols., 2002*). A los fetos aislados se les retiraba la cabeza y los órganos de la cavidad torácica y abdominal y se disgregaban totalmente en medio RPMI 2% FBS empleando un homogeneizador de vidrio tipo Potter. La suspensión celular resultante era filtrada a través de un algodón no graso humedecido con el mismo medio y centrifugada a 4°C a 1200 r.p.m. durante 15 min. Posteriormente, el sobrenadante era retirado y el *pellet* celular resuspendido en medio DMEM completo (Anexo I) procediéndose a su recuento empleando un hemocitómetro (cámara de Neubauer), excluyendo del conteo mediante el uso de Azul Tripán las células muertas que en este procedimiento eran las células mayoritarias de la suspensión celular. A continuación, las células eran cultivadas en un flask de 75cm² a 37°C y 5% CO₂. Tras 24 horas se observaban al microscopio invertido la presencia de células adheridas al sustrato con morfología fibroblástica, retirándose el medio de cultivo para eliminar los fragmentos celulares y las células no adherentes. Posteriormente, el flask era lavado con medio DMEM un par de veces para eliminar completamente las células no adheridas y a continuación, las adheridas se cultivaban con DMEM completo hasta confluencia. Las células se levantaban de la placa empleando tripsina atemperada (ThermoFisher Scientific, EEUU) a 37°C durante 5 min., que se neutralizaba incorporando DMEM con 2% de FBS. Posteriormente, las células eran lavadas y resuspendidas para su recuento celular. En este punto, las células podían ser usadas para la realización de RTOCs (ver más adelante) o congeladas en FBS al 10% de DMSO a -80°C para su uso posterior.

6.2. Cultivos tridimensionales (3D) de células epiteliales tímicas

El cultivo tridimensional de células epiteliales tímicas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Wong y colaboradores (*Wong y cols., 2014*). Se usaron 1×10^4 células epiteliales tímicas (EpCAM⁺CD45⁻UEA1⁻) procedentes de fetos de 12.5F aisladas mediante *sorting* (ver apartado 5.1) que eran cultivadas junto con 2.5×10^5 de MEF irradiados, en presencia o ausencia de timocitos (CD45⁺) de 12.5F, aislados también mediante *sorting*, en una relación 2:1 (10000 TEC + 5000 timocitos). Una vez que las células eran mezcladas y centrifugadas se resuspendían en 100 µL de medio de cultivo base para células epiteliales tímicas (Anexo I) previamente mezclado con Matrigel (Corning, EEUU) en una proporción 1:1. La suspensión celular era incubada a 37°C

durante 10 min., para que el Matrigel solidificase, depositándose en el interior de un inserto que contenía un filtro de politetrafluoroetileno de 0.4 μ m de poro (Merck Millipore, Alemania), el cual estaba colocado sobre un pocillo de una placa de cultivo de 24 (**Esquema 17**). Transcurrido este tiempo, alrededor del inserto se añadía medio completo que contenía medio de cultivo base para células epiteliales tímicas, toxina colérica ($1 \times 10^{-10} \text{M}$) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), heparina (0.0002% (v/v)) (STEMCELL Technologies, Canadá) y KGF (20ng/mL) (R&D Systems Minneapolis, EEUU).



Esquema 17. Modelo de cultivo epitelial 3D. Se muestra la organización del inserto donde se cultivan las TECs, junto con células CD45⁺ (T) y MEF, en una mezcla de Matrigel y medio base para células epiteliales tímicas. El *dot plot* muestra un ejemplo representativo de las diferentes subpoblaciones presentes en el cultivo tras análisis por citometría de flujo (CF).

El cultivo se mantenía durante 8 días a 37°C, 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂, renovándose el medio cada dos días. Tras los 8 días de cultivo, el medio era retirado y el inserto lavado cuidadosamente con PBS 1x, por fuera y por dentro, transfiriéndose a una nueva placa, incorporando en su interior 400 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con Liberasa (1U/mL) y DNasa I (0.2mg/mL) a 37°C durante 10 min. El contenido del inserto se homogeneizaba mecánicamente, sin romper la membrana, y de nuevo era incubado otros 10 min. Se realizó una segunda incubación para permitir disociar el contenido del inserto de su membrana. Posteriormente, el volumen era transferido a un tubo

Eppendorf al que se le incorporaban 400µL de medio RPMI 1640 suplementado con las enzimas indicadas anteriormente incubando a 37°C durante 10 min. Finalmente, la suspensión celular resultante se lavaba con FACS buffer para neutralizar las enzimas, y se centrifugaba a 4°C a 1500 r.p.m. durante 5 min. El *pellet* celular resultante era resuspendido en FACS buffer, determinado su número de células y tratados con diferentes combinaciones de anticuerpos para el análisis de las poblaciones de células epiteliales presentes por citometría de flujo.

6.3. Cultivos organotípicos de lóbulos tímicos fetales (FTOCs)

El cultivo organotípico de lóbulos tímicos fetales (FTOCs) de 13.5F o 14.5F, tanto WT como mutantes, se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Jenkinson y colaboradores (*Jenkinson y cols., 1982*). Los lóbulos aislados fueron transferidos con ayuda de una pipeta Pasteur fina sobre filtros estériles de policarbonato de 8µm de poro (Merck Millipore, Alemania) que flotaban en medio de cultivo RPMI 1640 completo (Anexo I). Los cultivos eran mantenidos a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 días cuando se empleaban lóbulos de 13.5F o 6 días cuando los lóbulos eran de 14.5F. Transcurrido este tiempo, el filtro era sumergido en una placa con medio RPMI 1640 nuevo y los lóbulos retirados del mismo con ayuda de unas pinzas. Estos lóbulos se utilizaron directamente para su análisis por citometría de flujo. En algunos casos, empleando lóbulos de 13.5F el medio de cultivo se suplementaba con proteínas de fusión solubles EphB2-Fc o ephrina-B1Fc (R&D Systems Minneapolis, EEUU) (10µg/mL) o como control del tratamiento, inmunoglobulinas G humanas (hIgG) (10µg/mL) (R&D Systems Minneapolis, EEUU), durante 2, 3 o 5 días.

Una variante de este tipo de cultivos se llevó a cabo para generar lóbulos tímicos alinfoides tanto WT como mutantes. Empleando lóbulos de 12.5F, 13.5F o 14.5F, el medio de cultivo fue suplementado con 2'-desoxiguanosina (2'-dGuo, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) a una concentración de 1.35 mM. La 2'-dGuo es un análogo del nucleótido citosina que incorporan las células en proliferación, impidiendo la correcta replicación de su ADN y de la progresión del ciclo celular, lo que conlleva en último término la muerte de las células que la han incorporado. Específicamente, el tratamiento de los lóbulos tímicos con este compuesto provoca la eliminación selectiva de células T y células dendríticas, produciendo lóbulos tímicos alinfoides (*Anderson y*

Jenkinson, 2001). En este caso, los lóbulos fueron cultivados el mismo periodo de tiempo que el indicado anteriormente para los lóbulos de 13.5F y 14.5F, pero solamente 3 días cuando se usaban de 12.5F. Estos lóbulos podían ser utilizados directamente para su análisis por citometría de flujo, en ensayos *in vivo* (Apartado 7) o *in vitro*:

- Lóbulos alinfoides procedentes de ratones de 12.5F fueron reagregados con MEF (ver más adelante).

- Lóbulos alinfoides procedentes de ratones de 13.5F cultivados nuevamente durante 5 días con medio RPMI 1640 completo suplementado con proteínas de fusión o sus controles a las concentraciones indicadas anteriormente y analizados por citometría de flujo.

- Lóbulos alinfoides procedentes de ratones de 14.5F fueron cultivados durante 4 días con medio RPMI 1640 completo suplementado con el anticuerpo agonista anti-RANK (R&D Systems Minneapolis, EEUU) (*Rossi y cols., 2007*) o un anticuerpo de cabra anti-IgG (Jackson ImmunoResearch, PA, EEUU) como control de isotipo, ambos a una concentración de 10µg/mL. Posteriormente, los lóbulos fueron analizados por citometría de flujo.

Para el análisis por citometría de flujo de los lóbulos alinfoides se realizaron *pools* con un mínimo de 3 lóbulos, mientras que aquellos que no habían sido cultivados en presencia de 2'-dGuo se analizaron individualmente.

6.4. Cultivos organotípicos de reagregados tímicos (RTOCs)

Este tipo de cultivo fue realizado empleando diferentes tipos celulares obtenidos como ya se han indicado, a partir de fetos WT de 12.5F que, posteriormente, eran reagregados con: MEF + estroma tímico, Matrigel o MEF + distintas subpoblaciones TEC WT, y MEF + distintas subpoblaciones TEC + células CD45⁺. Una vez obtenidas las distintas suspensiones celulares se mezclaban en un tubo Eppendorf de 1.5mL y se centrifugaban a 4°C durante 5 min. a 1500 r.p.m. Con el fin de concentrar al máximo las células y favorecer su reagregación, tras la centrifugación se retiraba la mayor parte del sobrenadante dejando aproximadamente unos 50µl en los que se volvían a resuspender las células y a centrifugar. Finalmente, era retirado todo el sobrenadante y con ayuda de una pipeta automática, ajustada a un volumen de entre 1-1.5µl, el

pellet era resuspendido empleando el escaso medio intersticial existente entre las células. Las células utilizadas en los reagregados con Matrigel se resuspendían en frío en 1µl del producto para evitar su solidificación. En todos los casos la suspensión celular concentrada era depositada sobre un filtro estéril de polycarbonato de 0.8µm de poro (Merck Millipore, Alemania) que flotaba sobre medio de cultivo RPMI 1640 completo (Anexo I). Los reagregados eran incubados a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, aquellos RTOCs formados correctamente mostraban en la periferia un halo claro al microscopio y un centro celular compacto y oscuro. En aquellos formados con Matrigel se obtuvo una especie de “lentilla” transparente y aplanada. Estos reagregados eran separados del filtro sumergiéndolo en una placa con medio RPMI 1640 y retirados después con ayuda de unas pinzas para su análisis posterior. Dependiendo del tipo de RTOC se realizaron las siguientes aproximaciones experimentales:

- RTOCs establecidos con MEF + estroma tímico eran congelados para su posterior estudio mediante inmunofluorescencia (ver más adelante).
- RTOCs establecidos con Matrigel o MEF + distintas subpoblaciones TEC WT eran trasplantados bajo la cápsula renal de ratones WT (ver más adelante) analizando su evolución por citometría de flujo.
- RTOCs establecidos con MEF + distintas subpoblaciones TEC + células CD45⁺ no se retiraban del filtro y se mantenían en cultivo *in vitro* durante 3 o 7 días para estudiar su evolución mediante citometría de flujo.

Una variante de este tipo de cultivo fue desarrollada empleando lóbulos tímicos WT de 14.5F que eran disgregados como se ha descrito en el apartado 3.1 y nuevamente reagregados, previa incubación con anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 (2.5µg) (R&D Systems Minneapolis, EEUU) o con sus controles de isotipo rata anti-IgG2a (R&D Systems Minneapolis, EEUU) o cabra anti-IgG (Jackson ImmunoResearch, PA, EEUU), respectivamente, a 4°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las células eran lavadas para retirar el exceso de anticuerpo no unido. También, lóbulos tímicos WT y mutantes (EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}) de 14.5F fueron disgregados e incubados en suspensión con PBS al 1% de FBS a 4°C durante 1 hora y nuevamente reagregados. Tras estos tratamientos previos, para la formación de los RTOCs, se procedió como se

ha descrito anteriormente y una vez establecidos se congelaron para su posterior análisis mediante inmunofluorescencia (ver más adelante).

7. TRASPLANTE DE LÓBULOS TÍMICOS FETALES ALINFOIDES DE 13.5F O RTOCs BAJO LA CÁPSULA RENAL

Con el fin de estudiar el potencial de diferenciación de estromas deficientes en EphB2 o EphB3 en presencia de progenitores linfoides WT, así como de estromas WT en presencia de progenitores linfoides deficientes, se implantaron lóbulos tímicos alinfoides de 13.5F (ver apartado 6.3) bajo la cápsula renal de ratones receptores en las condiciones anteriormente indicadas. También se trasplantaron estromas EphB2^{-/-} bajo la cápsula renal de ratones EphB3^{-/-} y viceversa, así como trasplantes de estromas EphB2LacZ en ratones WT, y estromas WT en ratones EphB2LacZ. En todos los casos se utilizaron como controles estromas WT trasplantados en ratones WT. La duración del implante en todas las condiciones fue de 3 semanas. En el caso de RTOCs establecidos con diferentes subpoblaciones de células epiteliales de 12.5F WT, los trasplantes se realizaron únicamente en ratones WT, durante 2 semanas en aquellos donde se empleaban MEFs y 4 semanas en los que utilizaban Matrigel.

Estos experimentos utilizaron como recipientes hembras WT o mutantes (EphB2^{-/-}, EphB2LacZ o EphB3^{-/-}) de 6 semanas de edad y en el caso de los RTOC, solamente hembras WT. En ambos casos, únicamente se implantó un lóbulo o RTOC por riñón, para ello los ratones receptores fueron anestesiados con una solución de ketamina-xilacina (Ketamina: Ketolar 50 mg/mL, (Grupo Pfizer, España)), Xilacina: Rompun 2% (Bayer, Alemania)) inyectada intraperitonealmente, accediéndose a su cavidad abdominal a través de una incisión dorsal por debajo de las costillas tanto en la piel como en el músculo. Tras la sujeción y exteriorización del riñón, la cápsula conjuntiva de éste se separó ligeramente del parénquima renal con ayuda de unas pinzas, implantando un lóbulo tímico entre ambos, a través de un orificio realizado en la cápsula con una cánula. La correcta localización del lóbulo tímico se aseguró visualmente. A continuación, se suturó con seda quirúrgica trenzada (Lorca Marín, Murcia, España) por separado las incisiones practicadas en la pared muscular y en la

piel, y se exponía al animal a un foco de calor para facilitar su recuperación. Transcurrido el tiempo del implante, los animales fueron sacrificados extrayendo ambos riñones y separando los lóbulos tímicos que habían crecido sobre el parénquima renal. Los lóbulos se procesaron según se ha indicado en apartados anteriores (apartado 3.3).

8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS CÉLULAS TÍMICAS

8.1. Aislamiento de ARN

Se utilizaron células epiteliales (EpCAM⁺CD45⁻) aisladas mediante *sortíng*, de lóbulos tímicos de 15.5F y 7PN o mesenquimales (EpCAM⁻CD45⁻) de 15.5F, según lo descrito en el apartado 5.1, y células tímicas totales procedentes de lóbulos de 12.5F obtenidos a partir de una misma camada (8-13 fetos). El *pellet* resultante se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta el aislamiento del ARN. Este aislamiento se realizó empleando el kit *RNAqueous[®]-Micro Kit* (ThermoFisher Scientific, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración y grado de pureza del ARN aislado se determinó empleando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, EEUU) utilizando el programa informático NanoDrop-1000 3.8.1.

8.2. Síntesis de ADNc mediante RT-PCR

La síntesis del ADN complementario (ADNc) necesaria para la determinación de la expresión génica se realizó a partir de muestras de ARN aisladas (apartado 8.1), empleando tanto muestras WT como mutantes, usando como molde 0.1µg de ARN y RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) mediante el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher Scientific, EEUU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ADNc resultantes fueron usados posteriormente para la realización de PCRs cuantitativas en tiempo real (qPCR), que determinan la expresión de diferentes genes.

8.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La cuantificación de la expresión génica de distintos genes implicados en el desarrollo tímico se realizó mediante el diseño de *primers* específicos para las secuencias génicas

que codifican para dichos genes. Las secuencias de estos *primers* fueron seleccionadas usando el programa informático *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (<https://lifescience.roche.com/shop/CategoryDisplay?catalogId=10001&tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>), a partir de la información disponible en la base de datos *Genebank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Una vez seleccionados los *primers* (*Forward* y *Reverse*), fueron sintetizados por Sigma-Genosys (Cambridgeshire, Reino Unido). Las secuencias de cada *primer*, así como el porcentaje de pares de base guanósina-citosina (%GC) y la temperatura de fusión (T_m : *melting temperature*) para cada uno de ellos se muestran en el Anexo II (Tabla 2). Para la determinación de la expresión génica, se empleó ADNc diluido 1/10 en presencia de la combinación específica de *primers* y el reactivo *SYBRGreen Power SYBR® Green PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante, empleado un volumen final máximo de 10 μ L. Los niveles de expresión se obtuvieron empleando el equipo *7900HT Fast Real-Time PCR system* del Centro de Genómica de la UCM, analizando los datos con el programa informático SDS2.3 acoplado a dicho equipo. Los valores obtenidos corresponden al valor RQ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) comparado entre los niveles de expresión de las muestras mutantes con respecto a las WT, estando relativizadas en ambos casos a la expresión del gen calibrador endógeno (HPRT1).

9. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

9.1. Preparación de muestras para estudios histológicos

Se obtuvieron criosecciones de 6 μ m (lóbulos tímicos de 7PN, 17.5F y RTOCs), 10 μ m (fetos completos de 14.5F y 15.5F) y 12 μ m (fetos completos de 12.5F y 13.5F) en un criostato Leica 1850 (Heidelberg, Alemania) a -20°C . Los fetos de 12.5F-15.5F se cortaron transversalmente pero con un pequeño grado de inclinación a fin de obtener secciones más grandes. En todos los casos, la adquisición de las muestras se realizó de manera seriada, de forma que en cada portaobjetos hubiera una representación de secciones tímicas a diferentes niveles (zona superior, intermedia e inferior del órgano). Tras la obtención de las muestras, se dejaron secar durante al menos 2 horas y, posteriormente se fijaron en acetona a TA durante 10 min. Una vez secos, las muestras

se conservan a -80°C en ambiente seco para su posterior uso, permitiendo así el análisis simultáneo de timos WT y mutantes en cada ensayo.

9.2. Estudio mediante inmunofluorescencia

Criosecciones de lóbulos tímicos postnatales, fetales, muestras procedentes de citocentrifugaciones con células epiteliales *nurse* (apartado 3.4) o RTOCs reagregados (apartado 6.4) fueron utilizados para el análisis de la expresión de diferentes moléculas (Tabla 1, Anexo III). Para ello, las muestras fueron hidratadas en PBS 1x frío durante 5 min. y posteriormente, se bloquearon las posibles uniones inespecíficas con PBS al 10% de FBS a TA durante 15 min. A continuación, las muestras se lavaron en PBS 1x frío durante 5 min. y se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda a TA con PBS 1x al 1% de FBS que contenía concentraciones saturantes de los anticuerpos purificados o sobrenadantes específicos de los diferentes marcadores estudiados que se enumeran en el Anexo III (Tabla 1). En el caso de la determinación de la expresión de EphB2, EphB3, ephrina-B1 y ephrina-B2 en células *nurse*, el tiempo de incubación del anticuerpo primario fue de 2 horas y media. Transcurrido este tiempo, las secciones se lavaron tres veces a 4°C durante 5 min. en PBS 1x y posteriormente, se incubaron con concentraciones saturantes de los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromo (Anexo III, Tabla 1), diluidos también en PBS 1x al 1% FBS. Tras 45 min. a TA y en cámara húmeda, las muestras se lavaron tres veces a 4°C durante 5 min. en PBS 1x. Para la visualización del núcleo celular se utilizó Hoechst 33342 ($0.2\mu\text{g}/\text{mL}$) incubando las muestras durante 2 min. y lavándolas como se ha indicado anteriormente. Las muestras fueron montadas en *SlowFade® Gold Antifade* (ThermoFisher Scientific, EEUU), selladas con laca de uñas y conservadas a 4°C en oscuridad hasta su análisis en un microscopio Zeiss Axioplan del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM, utilizando para la adquisición de las imágenes una cámara digital Spot 2 y el programa Metamorph 6.0 (Molecular Devices, Chicago, EEUU).

9.3. Análisis cuantitativo sobre secciones histológicas o citocentrifugaciones (CTC)

Una vez obtenidas las diferentes imágenes, en aquellos casos en los que se necesitaba un estudio cuantitativo de las muestras se empleó el programa informático Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, EEUU). Dependiendo del abordaje experimental, la estrategia seguida fue la siguiente:

- El porcentaje relativo de expresión de las moléculas CCL21, CCL25 y CXCL12, así como la expresión de claudinas 3,4 se determinó cuantificando el área ocupado por la expresión de cada una de ellas calculada en píxeles cuadrados, con respecto al área tímica total, expresando la relación en tanto por cien. En este caso, al menos 10 secciones no solapantes de tres timos independientes fueron analizadas.
- Para la determinación del número de células AIRE⁺ en timos de 17.5F y 7PN se contó el número de células AIRE⁺ existentes en el interior del área medular K5⁺. Este área calculada en píxeles cuadrados fue convertida a μm^2 multiplicando por un factor de conversión proporcionado por el programa Metamorph 6.0 (0,06774828 μm^2 para el objetivo de 40x), calculando al final el número de células AIRE⁺/mm². En este caso, fueron analizadas al menos 10 secciones no solapantes de tres timos independientes, tomadas a diferente profundidad (parte superior, media e inferior del lóbulo) como hemos descrito previamente.
- La cuantificación del número de timocitos englobados en los complejos linfopiteliales *nurse*, se determinó contando el número de timocitos (CD45⁺) en el interior de células epiteliales PanCK⁺, analizándose 30 complejos, tomados al azar, procedentes de citocentrifugaciones (CTC) realizadas a partir de 3 muestras independientes como se ha indicado en el apartado 3.4. Una vez contado el número de timocitos en los diferentes complejos, éstos se agrupaban en función de tal número, estableciéndose los siguientes rangos: 1-5, 6-10, 11-15, 16-20 y más de 21 timocitos.
- La cuantificación de la longitud de los procesos epiteliales en RTOC WT tratados con los anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3, así como en los establecidos con células EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} y en sus respectivos controles se realizó del siguiente modo: se identificaron las células epiteliales PanCK⁺ mejor definidas según su núcleo celular y sus procesos celulares sobre las secciones histológicas, midiéndose la longitud en

pixeles de los procesos celulares desde la periferia del núcleo hasta el extremo de los procesos. En el caso de los RTOC establecidos con células WT y tratados con los diferentes anticuerpos, se estudiaron tres reagregados en total de cada tipo analizando alrededor de 15 células/reagregado, con un rango de procesos celulares totales medidos entre 60 y 90. En los cultivos establecidos con células mutantes, también realizamos tres reagregados de cada tipo analizando alrededor de 20 células/reagregado con un número de procesos celulares totales evaluados de entre 90 y 150.

- La cuantificación del número y tamaño de las áreas medulares K5⁺ en RTOC WT tratados con los anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3, así como en aquellos formados con células mutantes EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} junto a sus respectivos controles se evaluó analizando tres secciones no solapantes a diferente altura de un total de 3 RTOC determinando el número de áreas K5⁺, así como el tamaño relativo de estas áreas con respecto a la sección tímica total. Debido a la gran dispersión entre los datos resultantes por sección para el cálculo del tamaño medular seleccionamos para cada uno el valor medio obtenido por sección y, posteriormente, realizamos la media de cada experimento. Esta media fue tratada como un dato único y analizada en conjunto con el resto de medias de los demás experimentos (n=3). Para determinar el número de médulas K5⁺ por sección contamos las áreas K5⁺ en cada una de ellas obteniendo a continuación, un valor medio de las mismas. Posteriormente, relativizamos este valor al mismo tamaño del área.

10. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE Eph MEDIANTE *Western Blot* (WB)

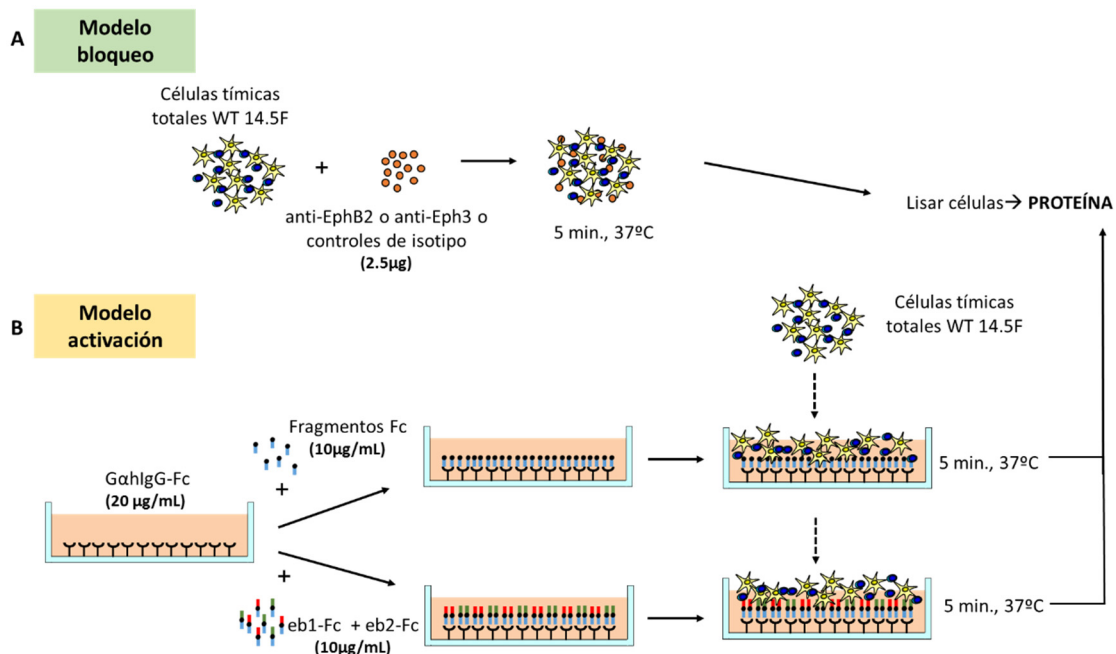
10.1. Preparación de muestras

Se emplearon células tímicas totales procedentes de fetos de 14.5F procesados según se ha descrito en el apartado 3.1. Una vez determinado el número de células tímicas totales obtenidas, se utilizaron entre 0.8×10^6 - 1×10^6 células para cada condición experimental en los diferentes ensayos que a continuación se detallan:

-Ensayos bloqueantes en suspensión con anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3: la suspensión celular fue incubada con 2.5 µg de los anticuerpos anti-EphB2 (monoclonal)

o anti-EphB3 (policlonal) (R&D Systems Minneapolis, EEUU) o sus correspondientes controles de isotipo: rata anti-IgG2a (R&D Systems Minneapolis, EEUU) o cabra anti-IgG (Jackson ImmunoResearch, PA, EEUU) respectivamente, a 37°C durante 5 min. El exceso de anticuerpo no unido se eliminó lavando las células con PBS 1x frío (**Ver esquema 18A**).

-Ensayos de activación mediados por las proteínas de fusión ephrina-B1Fc y ephrina-B2Fc ancladas a placa: Para la preclusterización de ambas moléculas, el fondo de los pocillos de placas de cultivo de 24 fue recubierto previamente con inmunoglobulina G humana específica para fragmentos Fc (GαhlgG-Fc) (Jackson ImmunoResearch, PA, EEUU) a 20µg/µL, a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, la placa era lavada con PBS 1x atemperado e incorporadas de forma conjunta las proteínas de fusión ephrina-B1Fc y ephrina-B2Fc (R&D Systems Minneapolis, EEUU) o los fragmentos Fc (R&D Systems Minneapolis, EEUU) usados como control, a 10µg/µL, a 37°C durante 1 hora. A continuación, la placa era nuevamente lavada con PBS 1x atemperado y añadidas las células que se dejaban decantar al fondo del pocillo y se incubaban 5 min. a 37°C, recogiendo después con PBS 1x frío (**Ver esquema 18B**).



Esquema 18. Modelo de bloqueo y activación de la señalización EphB/ephrina-B. Se muestra el modelo de bloqueo en suspensión (**A**) utilizando anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3, así como el modelo de activación en placa (**B**) empleando proteínas de fusión ephrina-B1Fc y -B2Fc previa preclusterización con anti-Inmunoglobulina G humana específica para fragmentos Fc. En ambos casos, la proteína obtenida se utiliza para medir los niveles de fosforilación total o específica de las Tirosinas de las proteínas EphB1+EphB2 o EphB3.

Una vez recogidos ambos tipos de suspensiones celulares se centrifugaban a 4°C a 1500 r.p.m. durante 5min. El *pellet* resultante era lisado mediante un tampón de lisis celular especial para la obtención de proteína (Anexo I) durante 10 min. en hielo y “vorteadas” con el fin de favorecer la lisis celular. A continuación, se centrifugaba a 4°C a 12000 r.p.m. durante 7 min. El sobrenadante, que contenía el lisado proteico, era transferido a un tubo Eppendorf frío y conservado a -20°C hasta su uso.

10.2. Cuantificación proteica

Antes de la realización del WB, la proteína total presente en las distintas muestras fue determinada mediante el método del ácido bicinconínico (método BCA, Thermo Fisher Scientific, EEUU), que combina la reacción de las proteínas con Cu^{2+} en un medio alcalino, que produce Cu^+ , con un reactivo para la detección de éste altamente selectivo y sensible denominado ácido bicinconínico, que presentaba un color púrpura con una fuerte absorbancia a 562nm. Antes de determinar la concentración de proteína total existente en nuestras muestras se realizó una curva patrón con diferentes soluciones de BSA (albúmina de suero bovino) de concentración conocida, siguiendo una dilución seriada a partir de una muestra a 2mg/mL, donde interpolábamos la absorbancia de nuestra muestra. Una vez preparadas e incubadas a 37°C durante 30 min., la absorbancia se medía en un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific, EEUU).

Una vez calculada la concentración proteica de la muestra, 10µg de proteína se diluían en tampón de carga a una concentración final 1-2x (Anexo I) en un volumen final máximo de 25µL que eran cargados en el gel.

10.3. Western Blot (WB)

El WB utilizó como tampón de electroforesis MOPS (ThermoFisher Scientific, EEUU), que permite resolver moléculas de alto peso molecular. Las diferentes muestras problema fueron hervidas a 95°C durante 2min. y junto con el patrón de peso molecular conocido (KDa, ThermoFisher Scientific, EEUU) eran cargadas, a continuación en un gel bis-tris de poliacrilamida al 4-12% (ThermoFisher Scientific, EEUU), sobre el que se realizaba una electroforesis (SDS-PAGE) durante 1 hora a 150V. Posteriormente, las proteínas se transferían sobre una membrana de polifluoruro de

vinilideno (PVDF) (BioRad, EEUU), previamente activada con metanol 100%, durante 1 hora a 100V. Trascurrido este tiempo, se realizó la detección antígeno-anticuerpo sobre la membrana transferida, bloqueando previamente con caseína 1x (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) durante 20 min. en balanceo, para evitar uniones inespecíficas. La membrana se incubó con un anticuerpo primario (Tabla 2, Anexo III) diluido en caseína 1x durante toda la noche a 4°C, en oscuridad y en balanceo. Posteriormente, la membrana era lavada 3 veces durante 10 min. con tampón Tris salino al 0.05% Tween20 (TBST; Anexo I). La detección del anticuerpo primario, siempre y cuando éste no llevara conjugado HRP (*Horseradish Peroxidase*) se llevó a cabo empleando un anticuerpo secundario (Tabla 2, Anexo III) durante una hora en oscuridad, a temperatura ambiente y en balanceo. Antes del revelado de la membrana, se lavaba 2 veces durante 10 min. en tampón TBST, y una vez más en TBS (Anexo I). Para el revelado de la membrana se utilizó luminol (*SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate*, ThermoFisher Scientific, EEUU), que al contacto de la misma con una película de autorradiografía, a diferentes tiempos según la proteína a detectar, quedaba impresionada.

En todos los casos, tras la detección de la proteína de interés, se eliminaban los anticuerpos (deshibridación), utilizando un tampón específico (Tampón de *stripping*; Anexo I) y se volvía a analizar la membrana incubando con un anticuerpo anti-GAPDH, usado como control de carga proteica y necesario para relativizar los niveles de fosforilación de cada muestra.

Las películas de autorradiografía fueron escaneadas en un equipo Bio-RAD (Bio-RAD, Barcelona, España) y analizadas con el programa informático Quantity One. La identificación de las bandas proteicas se realizó basándonos en el peso molecular indicado por las casas comerciales de los anticuerpos utilizados para su detección con respecto al patrón de proteínas de peso molecular conocido empleado. Los niveles de fosforilación total, EphB1-Ptyr594+EphB2-Ptyr604 y EphB3-Ptyr608 se cuantificaron delimitando el volumen ocupado por las diferentes bandas objeto de estudio calculando el valor del parámetro Adj. Vol. INT*mm² que representa la suma de las intensidades de los píxeles dentro de la zona delimitada por el volumen de un solo píxel (en mm²), restando en algunos casos la intensidad del fondo de la membrana cuando existiera. Para cada muestra, debido a la variabilidad en las mediciones a la

hora de delimitar el área, se hizo la media de tres mediciones independientes considerando a esta media el valor real para cada medición. El valor obtenido para cada proteína fosforilada se relativizó al obtenido con la proteína endógena GAPDH para normalizar los valores en las diferentes muestras. La determinación de los niveles de fosforilación se calculó relativizando los valores de cada tratamiento con respecto a los valores de su control asignando a este último el valor 1.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores obtenidos en cada procedimiento experimental fueron comparados mediante el análisis estadístico de la *t* de *Student*, indicando la significación estadística de los valores obtenidos (*p*-valor) como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según la prueba *T* de Microsoft Excel (Microsoft, EEUU). Además, antes de la prueba *T*, para determinar la asignación del tipo de varianza que teníamos que utilizar en dicho estudio, los valores fueron comparados mediante la prueba *F* de *Fisher*, que nos decía si las varianzas eran iguales o no. Si las varianzas eran homoscedásticas, se aplicaba el valor 2 en la prueba *T*, o el 3 cuando las varianzas eran heteroscedásticas. En el caso de los análisis de expresión génica, los valores mutantes normalizados fueron comparados respecto a los WT mediante el análisis estadístico *one t-test*. Los datos se muestran en todos los casos como la media \pm SD (desviación estándar) y se representan gráficamente con el programa Graph Pad Prism Software (versión 5.01, Graph Pad; California, EEUU).

ANEXO I

- **Medios de cultivo**

Medio RPMI completo

RPMI-1640¹

10% FBS²

1x Penicilina/Estreptomicina²

1x -Glutamina²

1x Piruvato sódico²

Cultivo base para células epiteliales

RPMI-1640¹

10% FBS²

55µM 2-mercaptoetanol (2-ME)²

10mM HEPES²

1x10³U/mL penicilina²

1x10⁴ µg estreptomicina²

2mM GlutaMAX²

1mM piruvato sódico²

0.1mM aminoácidos no esenciales²

5µg/mL insulina²

2.75µg/mL transferrina²

3.35ng/mL selenio²

2x10⁻⁹ M 3,3',5-Tri-Iodo-L-Tironina³

0.4µg/mL hidrocortisona³

24µg/mL adenina³

Medio DMEM completo

DMEM¹

10% FBS²

1x Penicilina/Estreptomicina²

1x -Glutamina²

1x Piruvato sódico²

¹Lonza, Bélgica;

²ThermoFisher Scientific, MA, EEUU;

³Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU

- **Soluciones y tampones**

PBS 10X (pH=7.2-7.4)

18.55mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ¹

83.97mM Na_2HPO_4 ¹

1.5M NaCl ¹

Diluir en H_2O

PBS 1X (pH=7.2-7.4)

100ml PBS 10x

900ml H_2O

FACS buffer

PBS 1x

1% FBS²

10mM EDTA¹

Tampón extracción ADN

10ml SDS 10% (dodecilsulfato sódico)³

5ml Tris-Cl 1M¹

2ml NaCl 5M¹

20ml EDTA 0.5M¹

63ml H_2O Milli-Q

Acetato Potásico

60mL Acetato Potásico 5M¹

11.5mL Ácido acético glacial¹

28.5mL H_2O

La solución resultante es 5M con respecto al ión acetato y 3M para el ión potasio

Tampón de carga (PCR convencional)

20 ml de H_2O

20 ml de glicerol³

0.1 g de Azul de bromofenol³

0.1 g de Naranja de acridina³

0.1 g de Cianol xileno³

Tris-Acetato EDTA (TAE) 50X

121g Tris base¹

28.55g Ácido acético glacial¹

50mL EDTA 0.5M pH=8¹

Completar hasta 500ml con H_2O

Tris-Acetato EDTA (TAE) 1X

100ml TAE 50x

4900ml H_2O

Tampón de lisis para eliminar eritrocitos160mM NH_4Cl ¹5.7mM K_2HPO_4 ¹0.1mM EDTA¹Diluir en H_2O 0.1mg/ml PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)³1X PI (Inhibidor proteasas)⁴50mM NaF (*Sodium fluoride*)³5mM Na_3VO_4 (*Sodium orthovanadate*)³ H_2O Milli-Q**Hoechst staining buffer (HSB)**2,5mL HBSS 10x (*Hank's Balanced Salt Solution*)²0.025g Glucosa³0.5mL HEPES 1M²6.25 μL Verapamil 100mg/mL³ H_2O hasta 25mL**TBS 10X**60.6g Tris base¹87.6g NaCl¹Completar hasta 1L con H_2O **TBS 1X**

100ml TBS 10x

900ml H_2O **Tampón de Anexina**Hepes 1M²NaCl¹0.1M CaCl_2 ¹**TBST**

TBS 1x

0.05% Tween-20³**Tampón de lisis para extracción de proteínas**50mM Tris pH 7.5¹10mM MgCl_2 ¹0.5M NaCl¹2% Igepal³**Tampón Stripping**3.75g Glicina³0.25g SDS³1.25mL Tween 20³ H_2O hasta 250mL

Ajustar pH 2.2

Tampón de carga 4x (WB)

0.8 g SDS³

2 ml 1M Tris pH 6.8¹

8 ml 50% glicerol³

800 µl 1M DTT (*1,4-Dithiothreitol*)³

2 mg azul bromofenol³

¹Panreac, Barcelona, España;

²ThermoFisher Scientific, MA, EEUU;

³Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU;

⁴Roche, Alemania

ANEXO II

Tabla 1: *Primers* utilizados en PCR convencional para el genotipado de los ratones utilizados en este trabajo.

GEN		Tm	Secuencia
EphB2	Alelo WT	60	ACGATTGCCTAGGCTCTTGCAGTAG
			GGGTACATCTCAGTGGTAGAATG
	Alelo mutante	60	GTCAGTTTCATAGCCTGAAGAACG
			GGGTACATCTCAGTGGTAGAATG
EphB2LacZ	Alelo WT	60	CACAAGTCATTTTTGCCACTCTAG
			TAAACGACGGGATCATCGCGAGCC
	Alelo mutante	60	AGCCATGGTACCTTGAGGCATTTG
			CACAAGTCATTTTTGCCACTCTAG
EphB3	Alelo WT	75	GCTCCCGATTTCGAGCGCATCG
			CCAGCAACGCCGTGTGACCTGTG
	Alelo mutante	75	ACCAGGGAGCTGGTGTAGGTGGG
			CCAGCAACGCCGTGTGACCTGTG

Programa de PCR para EphB2 y EphB2LacZ: 94°C 5min. + (94°C 30seg + 60°C 1min. + 72°C 1min.) x 35 ciclos + 72°C 10min. + mantener a 4°C

Programa de PCR para EphB3: 94°C 5min. + (94°C 30seg + 75°C 1min. + 72°C 1min.) x 35 ciclos + 72°C 10min. + mantener a 4°C

Tabla 2: *Primers* utilizados en qPCR para el análisis de la expresión de distintas moléculas.

GEN	Tm	%GC	Secuencia	
HPRT-1	59	53	<i>Forward</i>	CCTCCTCAGACCGCTTTTT
	59	43	<i>Reverse</i>	AACCTGGTTCATCATCGCTAA
$\beta 5t$	60	67	<i>Forward</i>	CTGTGGCTGGGACCACTC
	60	55	<i>Reverse</i>	ATCTCCCTGCAGACAAGTGC
CCL19	60	50	<i>Forward</i>	TGTGGCCTGCCTCAGATTAT
	59	48	<i>Reverse</i>	AGTCTTCCGCATCATTAGCAC
CCL21	60	56	<i>Forward</i>	TCCAAGGGCTGCAAGAGA
	60	53	<i>Reverse</i>	TGAAGTTCGTGGGGGATCT
DII4	60	55	<i>Forward</i>	AGGTGCCACTTCGGTTACAC
	60	50	<i>Reverse</i>	GGGAGAGCAAATGGCTGATA
Foxn1	60	55	<i>Forward</i>	TGACGGAGCACTTCCCTTAC
	60	48	<i>Reverse</i>	GACAGGTTATGGCGAACAGAA
IL7	59	58	<i>Forward</i>	CTGCTGCAGTCCCAGTCAT
	59	41	<i>Reverse</i>	TCAGTGGAGGAATTCCAAAGAT
LT β R	60	62	<i>Forward</i>	GCTCCAGGTACCTCCTACTCG
	59	53	<i>Reverse</i>	ATGGCCAGCAGTAGCATTG
RANK	59	61	<i>Forward</i>	GTGCTGCTCGTTCCACTG
	59	45	<i>Reverse</i>	AGATGCTCATAATGCCTCTCCT
FGF7	59	55	<i>Forward</i>	TGGCTGACACCATGACTAGC
	59	50	<i>Reverse</i>	GGCTACAGGCTGTCGTTTTT
FGFR2IIb	60	50	<i>Forward</i>	TGCATGGTTGACAGTTCTGC
	60	50	<i>Reverse</i>	TGCAGGCGATTAAGAAGACC

ANEXO III

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en Citometría de Flujo e Inmunofluorescencia.

Anticuerpos Citometría de Flujo (CF) o Inmunofluorescencia (IF)					
Anticuerpos	Clon	Especie	Fluorocromo/ Purificado/ Biotinilado/ Sobrenadante	Casa Comercial	Uso (CF o IF)
Anti-CD45	30-F11	Rata	PE PerCP/Cy5.5 Alexa Fluor® 647 APC/Cy7 Biotina	Biolegend ¹	CF, IF
Anti-CD326 (EpCAM)	G8.8	Rata	Alexa Fluor® 488 Alexa Fluor® 647		CF
Anti-Ly51	6C3	Rata	PE Alexa Fluor® 647		CF, IF
Anti-I-A/I-E (MHCII)	M5/114.1 5.2	Rata	APC Pacific Blue™		CF
Anti-CD40	3/23	Rata	PE	AbD Serotec ² Biolegend ¹	CF, IF
Anti-CD80	16-10A1	Hámster	Alexa Fluor® 647	Biolegend ¹	CF
Anti-CD205 (DEC205)	NLDC-145	Rata	PerCP/Cy5.5 Biotina		CF
Anti-MTS10	----	Rata	Sobrenadante	Cedido por Dr. Richard Boyd	IF
Anti-MTS20	----	Rata	Sobrenadante		CF, IF
UEA1 <i>Ulex europaeus</i> <i>agglutinin-1</i>	Lectina	----	FITC Biotina	Vector Labs ⁴	CF, IF
Anti-PanCK	C11	Ratón	FITC	Sigma ⁵	IF
Anti-Claudinas 3,4	Policlonal	Conejo	Purificado	Thermo Fisher Scientific ⁶	CF, IF
Anti-CCL21	Policlonal	Cabra	Purificado	R&D ⁷	IF
Anti-CCL25	Policlonal	Cabra	Purificado		IF
Anti-SDF1 (CXCL12)	Policlonal	Conejo	Purificado	Fitzgerald ⁸	IF
Anti-EphB2	Policlonal	Cabra	Purificado	R&D ⁷	CF, IF
Anti-EphB3	Policlonal	Cabra	Purificado		CF, IF
Anti-ephrina-B1	Policlonal	Cabra	Purificado		CF, IF
Anti-ephrina-B2	Policlonal	Cabra	Purificado		CF, IF
Anti-K5	Policlonal	Conejo	Purificado	Covance ⁹	IF
Anti-K8	Troma-1	Rata	Purificado	Hybridoma Bank ¹⁰	IF

	Anticuerpos	Clon	Especie	Fluorocromo/ Purificado/ Biotinilado/ Sobrenadante	Casa Comercial	Uso (CF o IF)
	Anti-CD44	IM7	Rata	Alexa Fluor® 488	Biolegend ¹	CF
	Anti-c-kit (CD117)	2B8	Rata	PE		CF
	Anti-CD4	GK1.5	Rata	APC		CF
	Anti-CD8α	53-6.7	Rata	APC	BD ¹¹	CF
	Anti-Lin	cocktail	Ratón	APC		CF
	Anti-CD25	PC61	Rata	PerCP/Cy5.5		CF
	Anti-Sca-1	D7	Rata	PE	Biolegend ¹	CF
	Anti-CD49f (integrina-α6)	GoH3	Rata	APC		CF
	Anti-Vγ3 TCR (Vγ5)	536	Hámster	FITC	BD ¹¹	CF
	Anti-CD45 RB	C363.16A	Rata	PE, PECy7		CF
	Anti-SSEA1	480	Ratón	PerCP/Cy5.5 FITC	Santa Cruz ¹²	CF, IF
	Anti-AIRE	5H12	Rata	Alexa Fluor® 647	BD ¹¹	IF
	Anti-PIRA/B	6C1	Rata	PE		CF
	Anti-β5t	Policlonal	Conejo	Purificado	MBL ¹³	CF, IF
	Anti-PDPN	8.1.1	Hámster	Alexa Fluor® 488	Biolegend ¹	IF
	Anti-CD254 (RANKL)	IK22/5	Rata	PE	Biolegend ¹	CF

	Anticuerpos	Especie	Fluorocromo	Casa Comercial	Uso (CF o IF)
Secundarios	Anti-rata IgG	Burro	Alexa Fluor® 594	Thermo Fisher Scientific ⁶	IF
	Anti-rata IgG	Burro	AMCA	Jackson ImmunoResearch ¹⁴	IF
	Anti-rata IgM	Cabra	PE		CF
	Anti-rata IgM	Cabra	DyLight™ 594		IF
	Anti-cabra IgG	Burro	Alexa Fluor® 488	Thermo Fisher Scientific ⁶	CF, IF
	Anti-conejo IgG	Burro	Alexa Fluor® 488		IF
	Anti-conejo IgG	Burro	AMCA	Jackson ImmunoResearch ¹⁴	IF
	Anti-conejo IgG	Burro	Alexa Fluor® 405	Thermo Fisher Scientific ⁶	IF
	Anti-conejo IgG	Burro	Alexa Fluor® 647		CF
	Anti-Biotin MicroBeads	----	----	Miltenyi Biotec ¹⁵	CF
	Estreptavidina	---	PECy7	eBioscience ¹⁶	CF
			Alexa Fluor® 405, 488	Thermo Fisher Scientific ⁶	IF, CF

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en *Western Blot*.

Anticuerpos <i>Western Blot</i>				
	Anticuerpos	Especie	Conjugado o no	Casa Comercial
Primarios	Anti-Phosphotyrosine 4G10 [®]	Ratón	HRP-conjugado	Millipore ¹⁷
	Anti-Phospho-EphB1 pTyr594+EphB2 pTyr604	Conejo	No	ThermoFisher Scientific ⁶
	Anti-Phospho-EphB3 pTyr608	Conejo	No	
	Anti-GAPDH	Conejo	No	Millipore ¹⁷
Secundario	Anti-conejo IgG-HRP	Cabra	HRP-conjugado	Santa Cruz ¹²

¹Biolegend, CA, EEUU; ²AbD Serotec, CA, EEUU; ³Abcam, MA, EEUU; ⁴ Vector Labs, CA, EEUU; ⁵Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU; ⁶ThermoFisher Scientific, MA, EEUU; ⁷R&D Systems Minneapolis, EEUU; ⁸Fitzgerald, MA, EEUU; ⁹Covance, CA, EEUU; ¹⁰*Developmental Studies Hybridoma Bank*, University of Iowa, EEUU; ¹¹BD Bioscience, CA, EEUU; ¹²Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU; ¹³MBL, Japón; ¹⁴Jackson ImmunoResearch, PA, EEUU; ¹⁵Miltenyi Biotec, Alemania; ¹⁶eBioscience, CA, EEUU; ¹⁷Merck Millipore, MA, EEUU



RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS TIMOS DEFICIENTES EN EPHB

1.1. Evolución de la celularidad tímica en ratones deficientes en EphB

Resultados previos de nuestro grupo habían demostrado que la falta de los receptores EphB2 y EphB3 cursaba con un descenso en la celularidad tímica total, tanto en estadios adultos como en estadios fetales (15.5F y 17.5F) y neonatales (2PN) (Alfaro y cols., 2008). Como el número de progenitores intratímicos comienza a ser relevante hacia 12.5F y éste es el primer estadio en que se puede aislar el primordio tímico al estar ya separado de la cavidad faríngea, decidimos analizar la celularidad tímica en los embriones desde este estadio en adelante (12.5F a 17.5F).

Tal y como se muestra en la **Figura 1**, la celularidad tímica en ratones WT, obtenida tras la digestión completa de los lóbulos tímicos (ver Material y Métodos), aumentaba gradualmente, disparándose a partir de 14.5F.

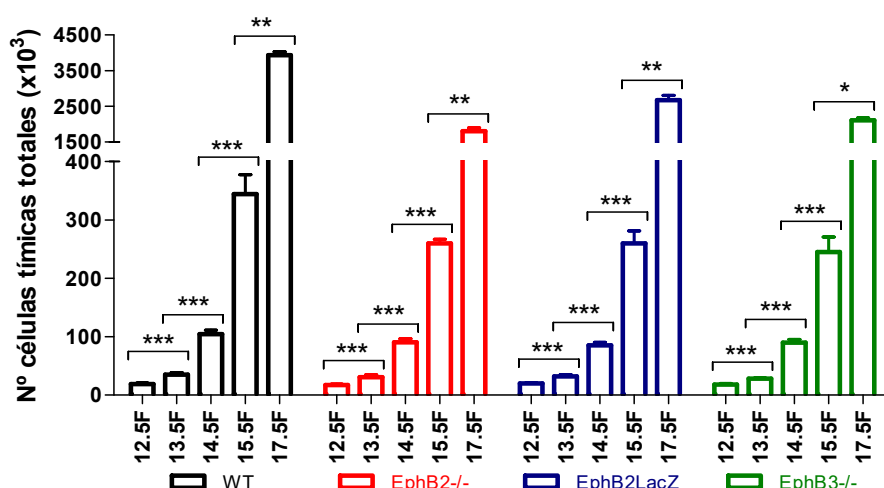


Figura 1. Evolución de la celularidad tímica en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las gráficas muestran la evolución de la celularidad tímica en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como incrementa de manera significativa la celularidad a lo largo del desarrollo en los diferentes animales analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio respecto del anterior y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

La celularidad de los timos EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} (**Fig. 1**) seguía el mismo patrón que el observado en los WT, incrementando también significativamente entre los estadios analizados. Sin embargo, en todos ellos hubo un descenso significativo de la celularidad a partir de 13.5F, pero no a 12.5F, respecto de los valores WT (**Fig. 2A, B**,

C); además, el incremento brusco en la celularidad observado a partir de 14.5F en los timos WT, era menos acusado, aun existiendo en los timos mutantes, con lo que las diferencias entre ambos eran más evidentes a partir de ese momento. Por otro lado, al compararse los timos deficientes entre sí, EphB2 vs EphB2LacZ (**Fig. 3A**) y EphB2 vs EphB3 (**Fig. 3B**) no se observaron diferencias significativas entre ellos, excepto a 17.5F entre timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ.

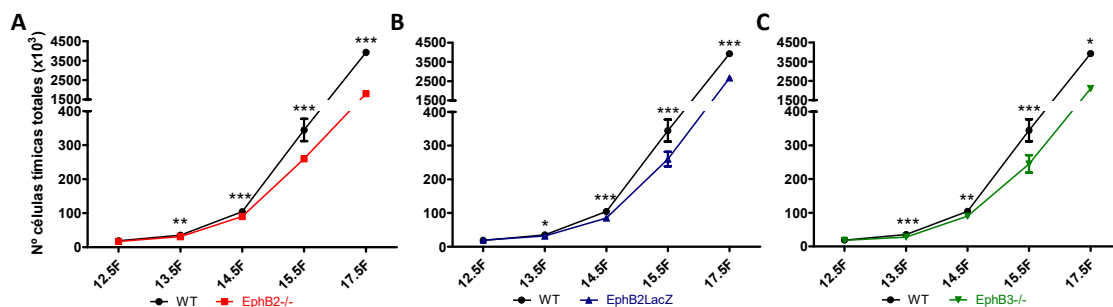


Figura 2. Análisis comparado de la celularidad tímica entre timos WT y EphB2^{-/-} (A), WT y EphB2LacZ (B) y WT y EphB3^{-/-} (C) a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran el incremento en la celularidad en los timos WT con respecto a los diferentes timos mutantes analizados. Todos los timos mutantes presentan una reducción significativa de la celularidad respecto de los timos WT a partir de 13.5F, pero no a 12.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por cada estadio. La significación estadística de los valores indicados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

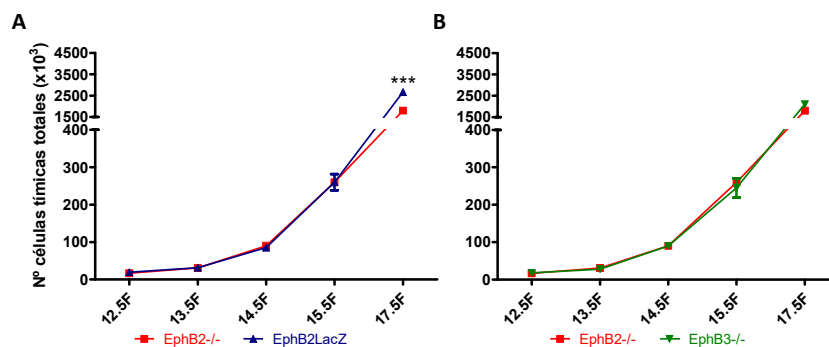


Figura 3. Análisis comparado de la celularidad tímica entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). (A) La gráfica muestra el incremento en la celularidad tímica entre los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, mostrando los primeros exclusivamente una reducción significativa a 17.5F. (B) Los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} muestran la misma celularidad tímica total en todos los estadios analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Además de analizar la celularidad tímica total, estudiamos la evolución de los porcentajes y números absolutos de distintas poblaciones celulares tímicas, tanto linfoides como estromales. Para ello llevamos cabo un análisis de dichas poblaciones

por citometría de flujo en base a la expresión de la molécula CD45 (**Fig. 4**), que define dos grandes poblaciones: por un lado, la que deriva del linaje hematopoyético ($CD45^+$) que engloba entre otras a los progenitores linfoides que colonizan el primordio tímico a 12F (*Itoi y cols., 2001*), y por otra, la estromal ($CD45^-$), que está constituida fundamentalmente por células epiteliales y células mesenquimales que pueden distinguirse entre sí por la expresión del marcador epitelial EpCAM (*Gray y cols., 2002*).

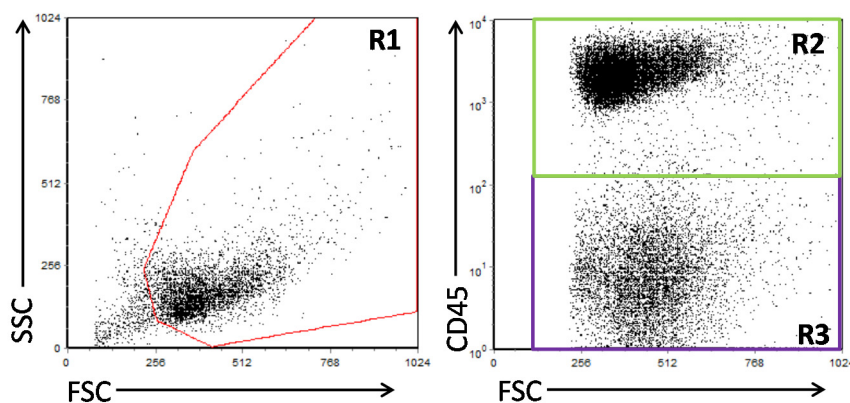


Figura 4. Identificación de las poblaciones tímicas principales: $CD45^+$ y $CD45^-$. Se definió la región R1 como la población tímica total en base a su tamaño y complejidad (FSC-SSC) y, a partir de ella, se identificaron dos poblaciones: $CD45^+$ (R2) y $CD45^-$ (R3). Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados.

Nuestros resultados mostraban que conforme avanzaba el desarrollo, el porcentaje de células WT $CD45^+$ (**Fig. 5A**, línea continua) incrementaba significativamente estadio a estadio (desde 12.5F a 17.5F), en correlación con un descenso significativo en la proporción de células $CD45^-$ (**Fig. 5A**, línea discontinua). La evolución en los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 5B**), EphB2LacZ (**Fig. 5C**) y EphB3^{-/-} (**Fig. 5D**) para ambas poblaciones ($CD45^+$, $CD45^-$) fue similar a la descrita en los timos WT; sin embargo, todos los valores mutantes mostraron un porcentaje significativamente menor de células $CD45^+$ ya a 12.5F (**Fig. 6**). Este descenso se mantenía hasta 17.5F en los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 6A**), hasta 13.5F y a 17.5F en los timos EphB2LacZ (**Fig. 6B**) y sólo era menor para EphB3^{-/-} en los estadios finales (15.5F y 17.5F, **Fig. 6C**).

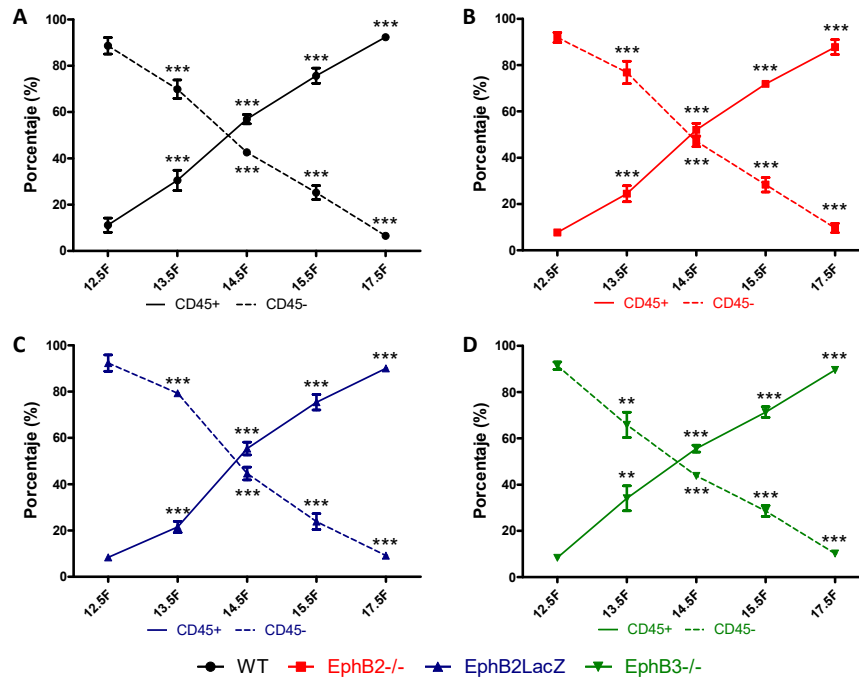


Figura 5. Evolución de los porcentajes de las poblaciones CD45⁺ y CD45⁻ en timos WT (A), EphB2^{-/-} (B), EphB2LacZ (C) y EphB3^{-/-} (D) a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran como conforme avanza el desarrollo fetal, tanto en timos WT como mutantes, se produce un incremento de la proporción de la población CD45⁺ (línea continua) y un descenso en la de las células estromales CD45⁻ (línea discontinua). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos compara un estadio respecto del anterior para cada una de las subpoblaciones y se indica como: * $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis de la t de Student.

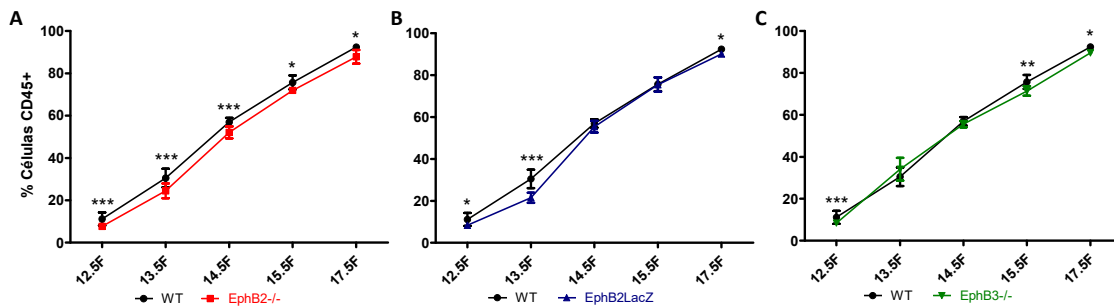


Figura 6. Comparación de la evolución en los porcentajes de la población tímica CD45⁺ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y EphB2^{-/-}, WT y EphB2LacZ y WT y EphB3^{-/-}. (A) La gráfica muestra como los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células CD45⁺ respecto a los timos WT en todos los estadios analizados. (B) Los timos EphB2LacZ tienen porcentajes reducidos de células CD45⁺ a 13.5F y a 17.5F. (C) Los timos EphB3^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células CD45⁺ que los timos WT, en todos los estadios excepto a 13.5F y 14.5F. Nótese como a 12.5F, todos los mutantes presentan menor porcentaje de células CD45⁺ que los timos WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se determinó comparando los valores WT y mutantes en cada estadio, y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Esta reducción en los porcentajes de células CD45⁺ mutantes respecto a los WT correlacionaba con un incremento significativo en el porcentaje de células CD45⁻ en todos ellos a 12.5F (**Fig. 7**); incremento que se mantuvo en todos los estadios en los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 7A**), solamente hasta 13.5F y a 17.5F en EphB2LacZ (**Fig. 7B**) y en los estadios finales en EphB3^{-/-} (**Fig. 7C**).

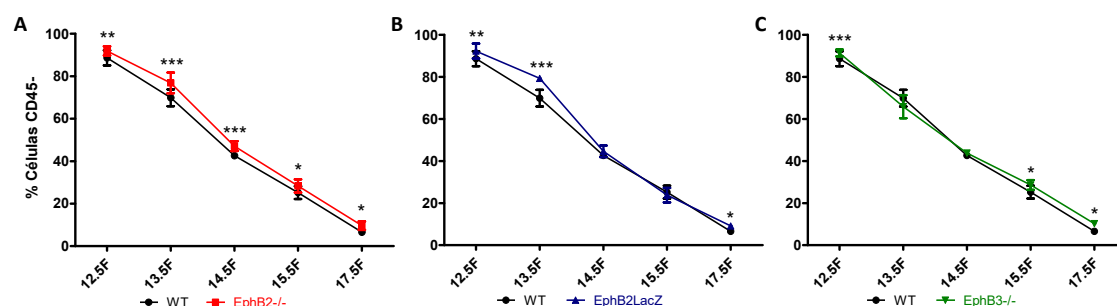


Figura 7. Comparación de la evolución en los porcentajes de la población tímica CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y EphB2^{-/-}, WT y EphB2LacZ y WT y EphB3^{-/-}. (A) La gráfica muestra como los timos EphB2^{-/-} tienen un porcentaje significativamente mayor de células CD45⁻ que los timos WT en todos los estadios analizados. (B) Los timos EphB2LacZ tienen un porcentaje significativamente mayor de células CD45⁻ que los timos WT en todos los estadios, excepto a 14.5F y 15.5F. (C) Los timos EphB3^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor de estas células que los timos WT, en todos los estadios, excepto a 13.5F y 14.5F. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados por cada estadio. La significación estadística de los valores observados se obtuvo comparando los valores WT y mutantes en cada estadio, y se indica como: *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.005 según el análisis estadístico de la t de Student.

Por otro lado, las proporciones de células CD45⁺ siempre eran menores en EphB2^{-/-} que en los otros mutantes (**Fig. 8**), aunque las diferencias eran sólo significativas a 15.5F respecto a los valores de EphB2LacZ (**Fig. 8A**) y a 13.5F en comparación con los de timos EphB3^{-/-} (**Fig. 8B**). En estos mismos estadios, había diferencias significativas entre los distintos mutantes en la proporción de células CD45⁻ (**Fig. 8C, D**), pero en este caso, las proporciones de células estromales de timos EphB2^{-/-} eran significativamente más altas que las de los otros mutantes.

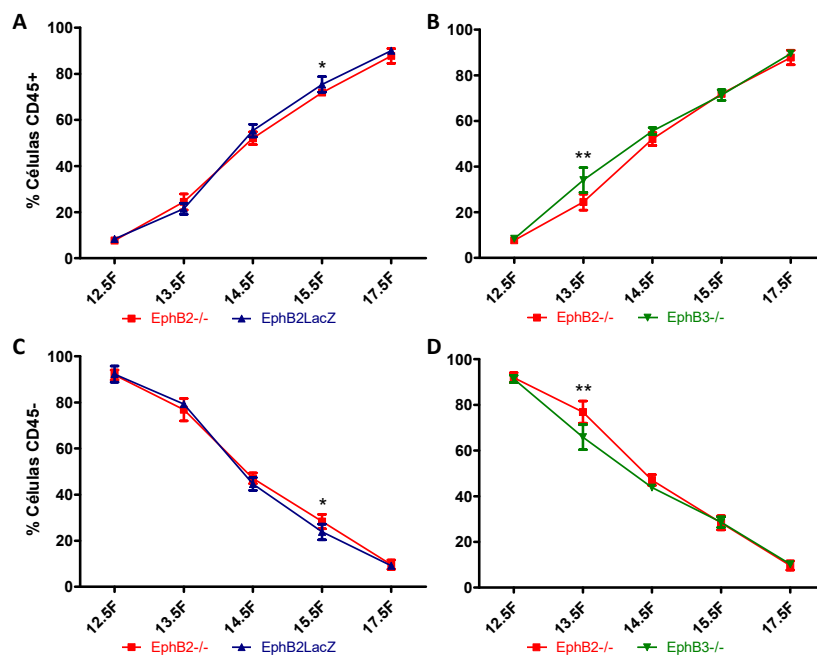


Figura 8. Análisis comparado de la evolución de los porcentajes de las poblaciones CD45⁺ y CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. (A) Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células CD45⁺ sólo a 15.5F respecto de los timos EphB2LacZ. (B) Los timos EphB2^{-/-} presentan significativamente menor porcentaje de células CD45⁺ sólo a 13.5F respecto de los timos EphB3^{-/-}. (C) Los timos EphB2^{-/-} tienen significativamente mayor porcentaje de células CD45⁻ sólo a 15.5F respecto de los timos EphB2LacZ. (D) Los timos EphB2^{-/-} sólo tienen un porcentaje significativamente mayor de células CD45⁻ a 13.5F respecto de los timos EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ según el análisis estadístico t de Student.

Para comprobar la contribución de cada una de las dos subpoblaciones a la hipocelularidad tímica total observada en los ratones mutantes, se analizaron los números absolutos de cada una de ellas. Tal y como se representa en las gráficas correspondientes, el número de células linfoides WT CD45⁺ (**Fig. 9**) aumentaba significativamente entre 12.5F y 17.5F, con un fuerte incremento a partir de 14.5F. Este incremento de células CD45⁺ también se producía en los timos mutantes (**Fig. 9**). Sin embargo, el número de células en los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 10A**), EphB2LacZ (**Fig. 10B**) y EphB3^{-/-} (**Fig. 10C**) era significativamente menor que el de los timos WT en todos los estadios analizados, pero particularmente evidente a partir de 14.5F. En este estadio, la expansión celular no era tan acusada como la observada en los timos WT (**Fig. 10**). De nuevo, sólo hubo diferencias significativas al comparar los números de células de los timos mutantes EphB2^{-/-} y EphB2LacZ a 17.5F (**Fig. 11A**), pero no entre

EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} (**Fig. 11B**). En este sentido, llama la atención que el aumento de células CD45⁺ que ocurre en timos WT entre 15.5F y 17.5F también se da en los EphB2LacZ, pero es menor en EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} (**Fig. 10**), lo que hace que a 17.5F haya significativamente más células CD45⁺ en EphB2LacZ que en EphB2^{-/-} (**Fig. 11**).

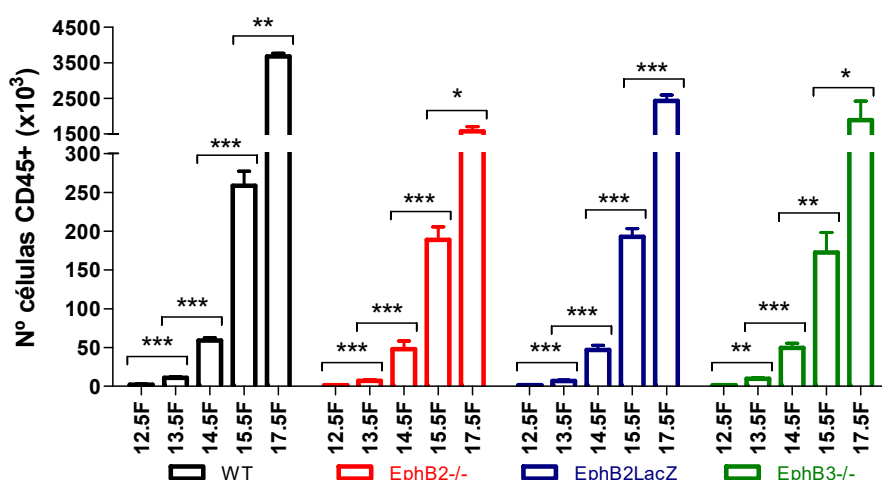


Figura 9. Evolución de la celularidad de la población CD45⁺ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las gráficas muestran la evolución de la celularidad CD45⁺ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese el incremento de la celularidad a lo largo del desarrollo en los diferentes animales analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio respecto del anterior y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

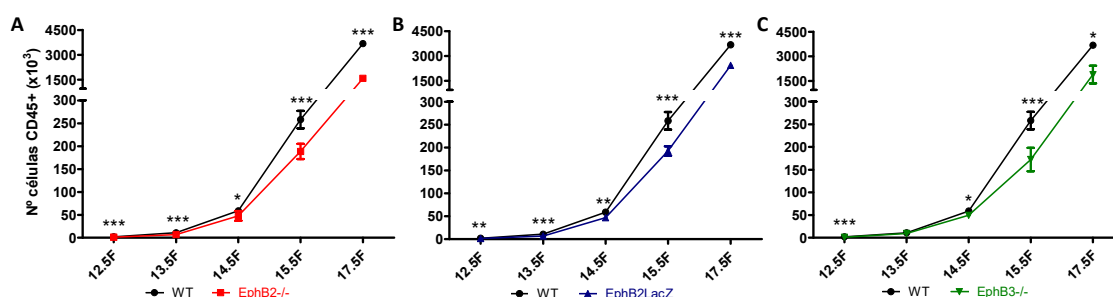


Figura 10. Comparación de la evolución del número de células CD45⁺ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y EphB2^{-/-} (A), WT y EphB2LacZ (B) y WT y EphB3^{-/-} (C). Las gráficas muestran el incremento en la celularidad en los timos WT con respecto a los diferentes timos mutantes analizados. Todos los timos mutantes presentan desde 12.5F un número significativamente menor de células CD45⁺ respecto a los timos WT, excepto los EphB3^{-/-} a 13.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores observados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

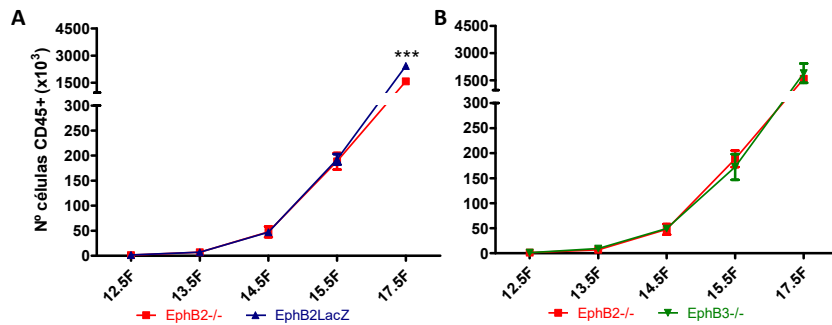


Figura 11. Análisis comparado de la evolución del número de células CD45⁺ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. (A) No hay diferencias significativas en el número de células CD45⁺ en los timos EphB2^{-/-} respecto a los EphB2LacZ, salvo a 17.5F. (B) Tampoco hay diferencias en la celularidad de la población CD45⁺ entre los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Por otro lado, el número absoluto de células estromales CD45⁻ en ratones WT (**Fig. 12**) incrementaba también significativamente a lo largo del desarrollo, y particularmente a partir de 15.5F. La cinética de crecimiento de las células CD45⁻ era similar en los animales mutantes (**Fig. 12**), pero el incremento observado a partir de 15.5F era menos acusado en éstos, especialmente en los timos EphB2^{-/-}, que en los ratones WT.

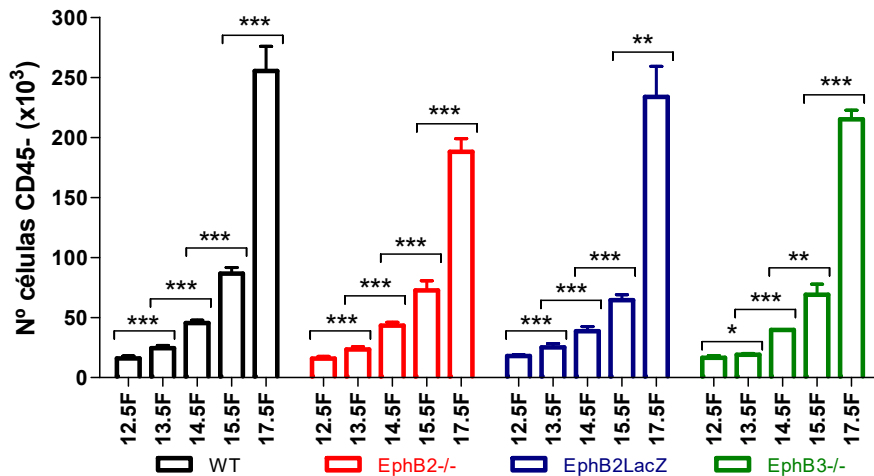


Figura 12. Evolución de la celularidad de la población CD45⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las gráficas muestran la evolución de la celularidad CD45⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese el incremento de la celularidad a lo largo del desarrollo en los diferentes animales analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio respecto del anterior y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Cuando se compararon los valores mutantes y los WT, se vio que en todos ellos había una reducción significativa en el número de células CD45⁺ a partir de 15.5F (**Fig. 13**). Curiosamente, no había diferencias entre WT y EphB2^{-/-} en los primeros estadios (**Fig. 13A**), pero sí con los otros dos mutantes (salvo con EphB2LacZ a 13.5F y EphB3^{-/-} a 12.5F) (**Fig. 13B, C** respectivamente).

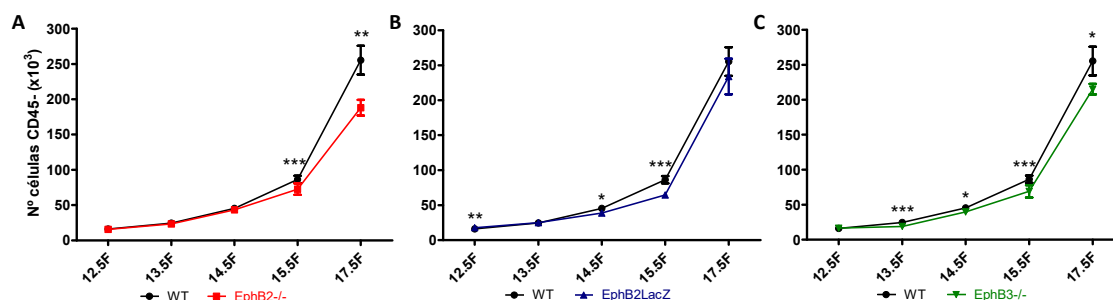


Figura 13. Análisis comparado de la evolución del número de células CD45⁺ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y EphB2^{-/-}, WT y EphB2LacZ y WT y EphB3^{-/-}. **(A)** Los timos EphB2^{-/-} presentan un número significativamente menor de células CD45⁺ los timos WT desde 15.5F. **(B)** Los timos EphB2LacZ tienen un número significativamente menor de células desde 14.5F respecto a los timos WT. **(C)** Los timos EphB3^{-/-} presentan un número significativamente menor de células desde 13.5F respecto a los timos WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se obtuvo comparando con los valores WT y mutantes en cada estadio, y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Las diferencias eran mínimas al comparar el número de células CD45⁺ entre los timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (**Fig. 14A**) y entre los timos mutantes EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (**Fig. 14B**), salvo entre los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} a 13.5F, probablemente por la mera variabilidad entre especímenes. No obstante, a 17.5F, ambos mutantes EphB2LacZ y EphB3^{-/-} presentaban mayor número de células que los EphB2^{-/-}, aunque no de forma significativa.

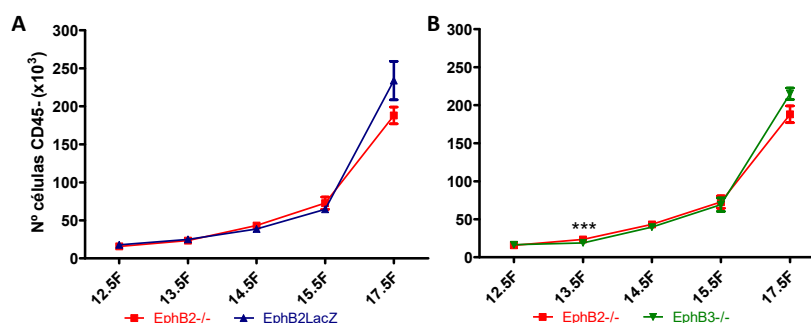


Figura 14. Análisis comparado de la evolución del número de células CD45⁺ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. La gráfica muestra la falta de diferencias significativas en el número de células CD45⁺ entre timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ (**A**), y entre los primeros y EphB3^{-/-}, excepto a 13.5F (**B**). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Puesto que las células del estroma tímico incluyen poblaciones epiteliales y mesenquimales, utilizamos el marcador epitelial EpCAM (*Rossi y cols., 2007*) para separarlas en dos subpoblaciones. Dentro de la población CD45⁻ se define una población de células epiteliales tímicas totales que expresan EpCAM (EpCAM⁺CD45⁻) y una población mesenquimal que no expresa EpCAM (EpCAM⁻CD45⁻) (**Fig. 15**).

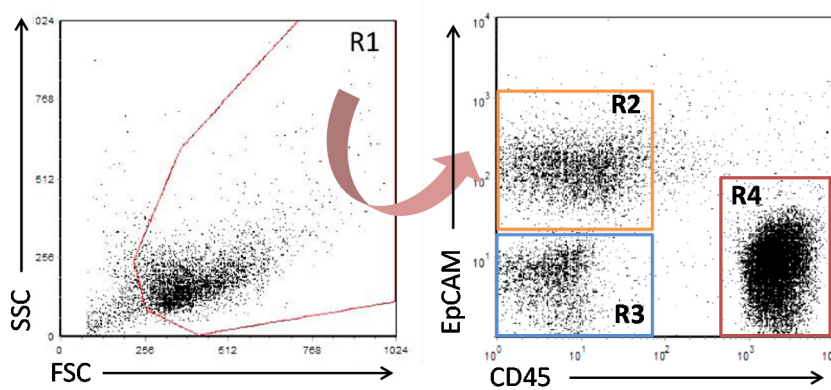


Figura 15. Identificación de las subpoblaciones tímicas epitelial y mesenquimal en base a la expresión del marcador EpCAM (EpCAM⁺CD45⁻ y EpCAM⁻CD45⁻) a 15.5F. Se delimitó la región R1 como la población tímica total en base a su tamaño y complejidad (FSC-SSC), y a partir de ella se identificaron tres subpoblaciones en base a la expresión de EpCAM y CD45: EpCAM⁺CD45⁻ (R2, células epiteliales), EpCAM⁻CD45⁻ (R3, células mesenquimales) y EpCAM⁻CD45⁺ (R4, timocitos). Las acotaciones R2 y R3, por tanto, permiten la identificación de las dos poblaciones en base a la expresión del marcador EpCAM. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados.

En los timos WT (**Fig. 16**), el porcentaje de células epiteliales (EpCAM⁺CD45⁻) disminuía significativamente a lo largo del desarrollo fetal. La misma tendencia fue observada para esta población en los timos mutantes EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} (**Fig. 16**), aunque el perfil en estos últimos era algo diferente con una caída mucho más pronunciada a 13.5F. Comparando los valores mutantes con los WT se observó que la población EpCAM⁺CD45⁻ era significativamente mayor desde 12.5F hasta 15.5F en EphB2^{-/-} (**Fig. 17A**), y sólo a 13.5F en EphB2LacZ (**Fig. 17B**). No había diferencias, curiosamente, entre EphB3^{-/-} y WT (**Fig. 17C**). Al comparar la población entre timos mutantes se observó que en algunos estadios los timos EphB2^{-/-} presentaban mayores porcentajes que EphB2LacZ (todos menos 13.5F; **Fig. 18A**) o que EphB3^{-/-} (13.5F y 14.5F; **Fig. 18B**).

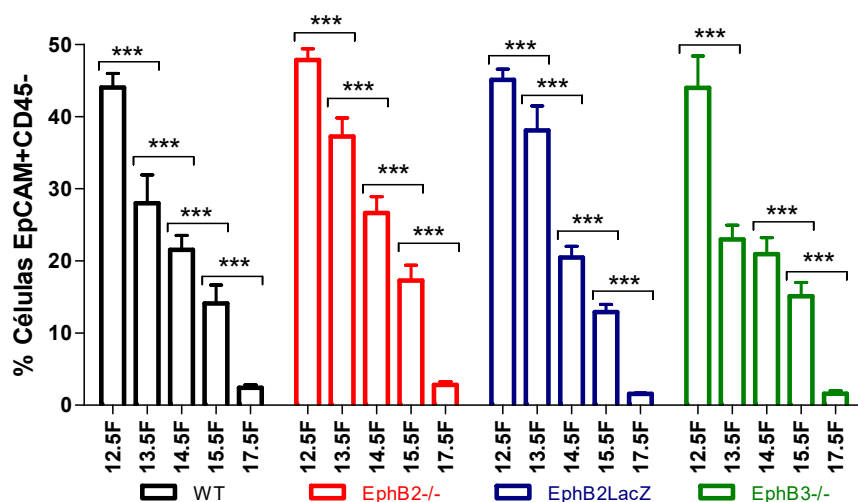


Figura 16. Evolución del porcentaje de células epiteliales tímicas (EpCAM⁺CD45⁺) en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las gráficas muestran la evolución del porcentaje de células EpCAM⁺CD45⁺ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como se reduce la proporción de células epiteliales a lo largo del desarrollo en los diferentes animales analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio respecto del anterior y se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

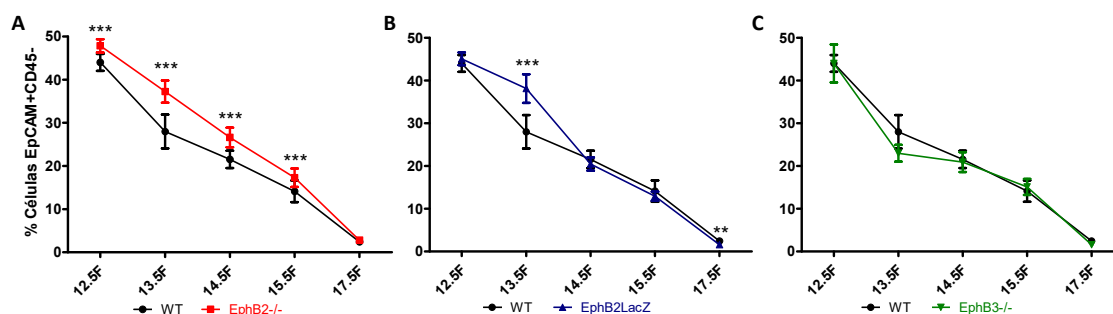


Figura 17. Análisis comparado de la evolución del porcentaje de células EpCAM⁺CD45⁺ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y EphB2^{-/-}, WT y EphB2LacZ y WT y EphB3^{-/-}. (A) Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor de células EpCAM⁺CD45⁺ entre 12.5F y 15.5F respecto a los timos WT. (B) Los timos EphB2LacZ, por el contrario, sólo muestran un porcentaje significativamente mayor a 13.5F respecto a los timos WT. (C) Los timos EphB3^{-/-} no tienen diferencias significativas respecto a los WT en ningún estadio analizado. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por cada estadio. La significación estadística de los valores observados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio, y se indica como: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

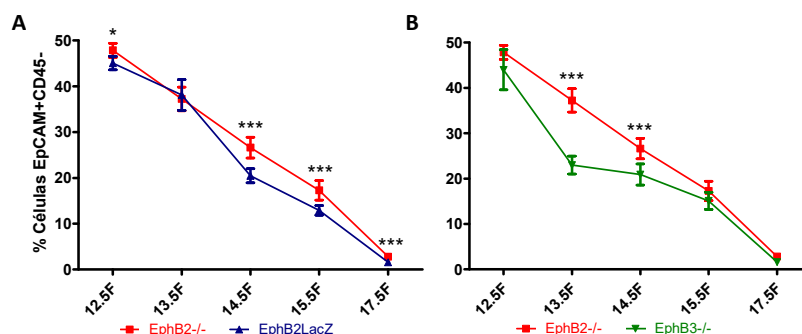


Figura 18. Análisis comparado de la evolución del porcentaje de células EpCAM⁺CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. (A) Los timos EphB2^{-/-} presentan mayor porcentaje de células epiteliales entre 14.5F y 17.5F respecto a los timos EphB2LacZ (B) y respecto de los timos EphB3^{-/-} a 13.5F y 14.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; * $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.**

En números absolutos la población EpCAM⁺CD45⁻ incrementaba gradualmente a lo largo del desarrollo (**Fig. 19**), tanto en timos WT como mutantes, con diferencias significativas entre los distintos estadios, salvo para los timos mutantes en los que el crecimiento parecía estancarse entre 15.5F y 17.5F.

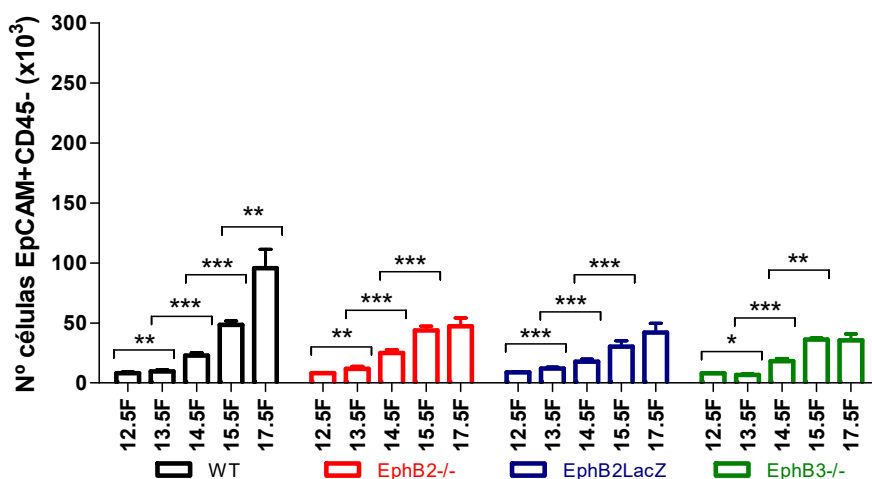


Figura 19. Evolución del número de células epiteliales tímicas (EpCAM⁺CD45⁻) en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las gráficas muestran la evolución en el número de células EpCAM⁺CD45⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese el incremento del número de células epiteliales a lo largo del desarrollo en los diferentes animales analizados hasta 15.5F, pero no a 17.5F en los timos mutantes. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio respecto del anterior y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.**

Sin embargo, al comparar los valores mutantes con los datos WT (**Fig. 20**) confirmábamos un retraso en la progresión de las células epiteliales EpCAM⁺CD45⁻ que era particularmente evidente en EphB3^{-/-} y menor en EphB2LacZ y EphB2^{-/-}. Así, los valores de los tres mutantes no mostraban diferencias significativas con respecto a los WT a 12.5F (**Fig. 20A, B, C**), pero eran más altas a 13.5F en los EphB2^{-/-} (**Fig. 20A**) y en los EphB2LacZ (**Fig. 20B**) y no en los EphB3^{-/-} (**Fig. 20C**). Como antes indicábamos, el número de TECs se bloqueaba literalmente entre 15.5F y 17.5F por lo que los timos mutantes tenían valores significativamente más bajos que los WT.

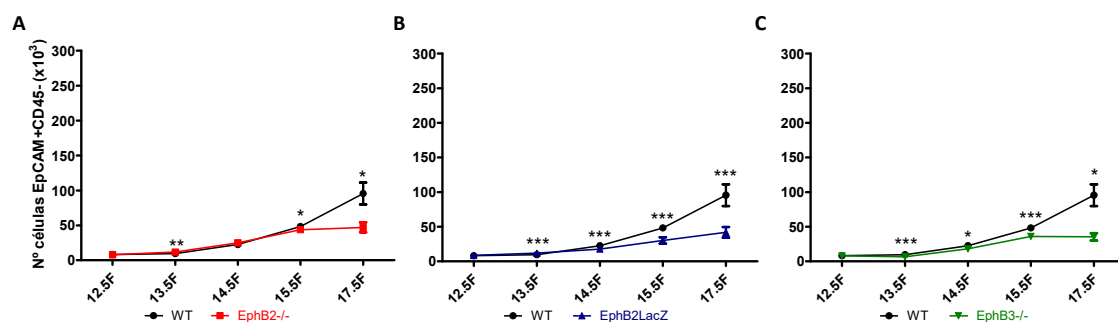


Figura 20. Estudio comparado de la evolución del número de células EpCAM⁺CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y EphB2^{-/-}, WT y EphB2LacZ y WT y EphB3^{-/-}. Notar la falta de diferencias en el número de células EpCAM⁺CD45⁻ entre timos WT y mutantes a 12.5F y su caída a 17.5F (A, B y C). **(A)** Los timos EphB2^{-/-} presentan un número significativamente mayor de células EpCAM⁺CD45⁻ a 13.5F, pero menor desde 15.5F respecto a los timos WT. **(B)** Los timos EphB2LacZ presentan un número significativamente menor de células EpCAM⁺CD45⁻ desde 14.5F, pero más alto a 13.5F respecto a los WT. **(C)** Los timos EphB3^{-/-} muestran un número significativamente menor de células EpCAM⁺CD45⁻ desde 13.5F respecto a los WT. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores observados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Al comparar esta población entre los distintos timos mutantes se observaba que los ratones EphB2^{-/-} siempre tenían mayor número de células EpCAM⁺CD45⁻ que los EphB2LacZ entre 14.5F y 15.5F (**Fig. 21A**) y desde 13.5F con respecto a EphB3^{-/-} (**Fig. 21B**).

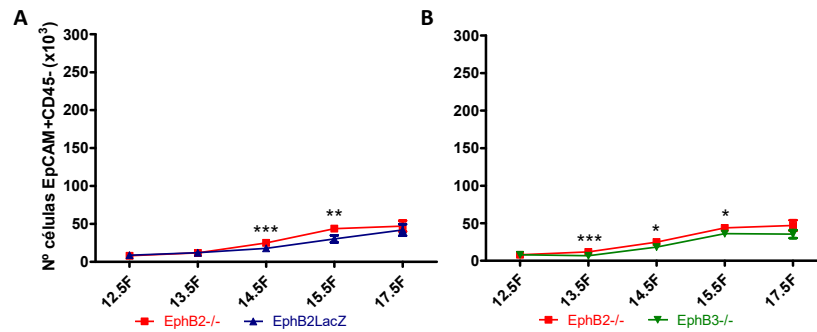


Figura 21. Análisis comparado de la evolución del número de células EpCAM⁺CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. (A) Los timos EphB2^{-/-} presentan mayor número de células EpCAM⁺CD45⁻ entre 14.5F y 15.5F que los timos EphB2LacZ, y en todos los estadios salvo el inicial y el final respecto a los timos EphB3^{-/-} **(B)**. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

El porcentaje de células mesenquimales EpCAM⁺CD45⁻ disminuía significativamente a partir de 13.5F a lo largo del desarrollo fetal, tanto en el timo de animales WT como deficientes para EphB2, EphB2LacZ o EphB3, con una fuerte caída entre este estadio y el siguiente (**Fig. 22**). No había diferencias en el porcentaje de células mesenquimales entre timos mutantes y WT, excepto a 17.5F (**Fig. 23**) y era ligeramente menor en algunos estadios en los timos EphB2^{-/-} respecto de los EphB2LacZ y EphB3^{-/-} (**Fig. 24**).

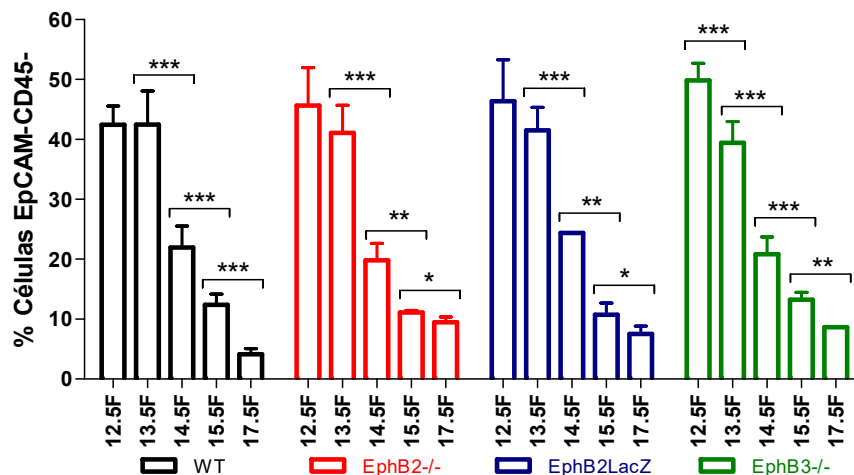


Figura 22. Evolución del porcentaje de células mesenquimales (EpCAM⁺CD45⁻) en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las gráficas muestran la evolución del porcentaje de células EpCAM⁺CD45⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese la reducción en la proporción de células mesenquimales a lo largo del desarrollo en los diferentes animales analizados, con una fuerte caída en los timos WT entre 15.5F y 17.5F no tan pronunciada en los mutantes. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio respecto del anterior y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

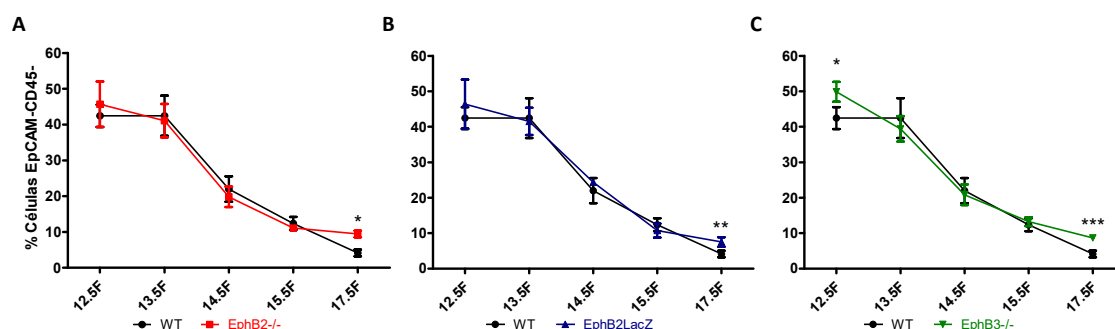


Figura 23. Análisis comparado de la evolución del porcentaje de células EpCAM⁺CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y EphB2^{-/-}, WT y EphB2LacZ y WT y EphB3^{-/-}. Los timos EphB2^{-/-} (A), EphB2LacZ (B) y EphB3^{-/-} (C) no muestran diferencias significativas en el porcentaje de células EpCAM⁺CD45⁻ entre 12.5F y 15.5F respecto a los timos WT, excepto a 12.5F para los EphB3^{-/-}. En cambio, a 17.5F los timos mutantes presentan valores significativamente mayores que los WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por cada estadio. La significación estadística de los valores observados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio, y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

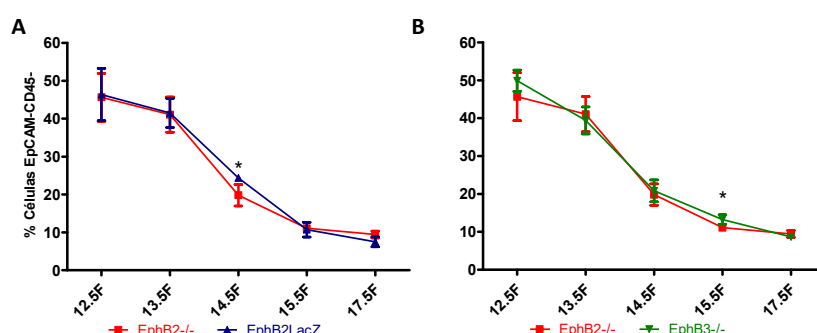


Figura 24. Análisis comparado de la evolución del porcentaje de células EpCAM⁺CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. (A) Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células mesenquimales a 14.5F respecto de los timos EphB2LacZ (B) y a 15.5F respecto de los EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados por cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Al analizar el número absoluto de células EpCAM⁺CD45⁻ se observó un aumento significativo durante el desarrollo, muy pronunciado entre 15.5F-17.5F, tanto en los timos WT como en los timos mutantes (Fig. 25), cuando el número de células tímicas totales aumentaba enormemente (Fig. 1).

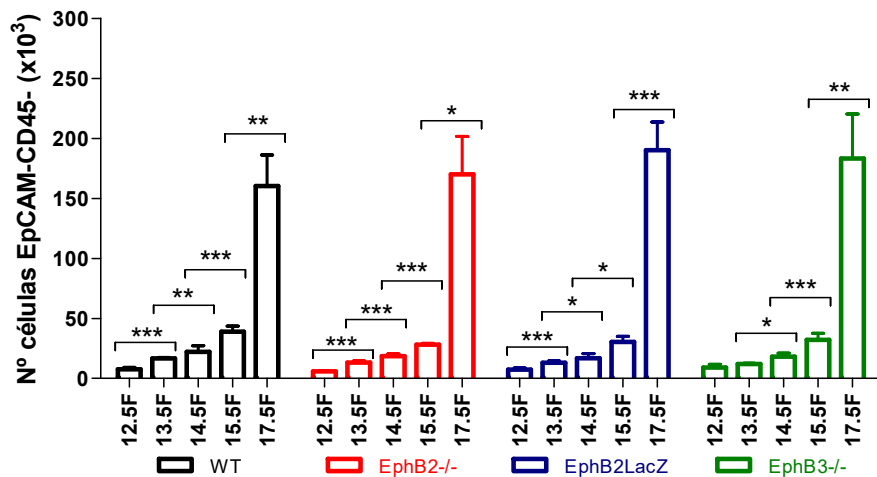


Figura 25. Evolución del número de células mesenquimales (EpCAM⁻CD45⁻) en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las gráficas muestran la evolución en el número de células EpCAM⁻CD45⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese el incremento gradual del número de células mesenquimales a lo largo del desarrollo en los diferentes animales analizados hasta 15.5F y, particularmente a 17.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio respecto del anterior y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Al comparar los valores mutantes con los WT (**Fig. 26A-C**), se confirmaba que la evolución de los valores era la misma, aunque en general, en los tres casos eran ligeramente menores hasta 15.5F, con diferencias significativas en algunos estadios, y ligeramente superiores a 17.5F en los timos EphB2LacZ (**Fig. 26B**) y EphB3^{-/-} (**Fig. 26C**), pero sin significación estadística. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los valores mutantes EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (**Fig. 27A**) y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (**Fig. 27B**). Estos datos indican, por un lado, que a menor tamaño tímico, menor número de células mesenquimales y, por otro, que el descenso en el número de células CD45⁻ observado a partir de 15.5F en los timos mutantes se debía básicamente a una reducción de la población epitelial EpCAM⁺CD45⁻ y no de la mesenquimal EpCAM⁻CD45⁻.

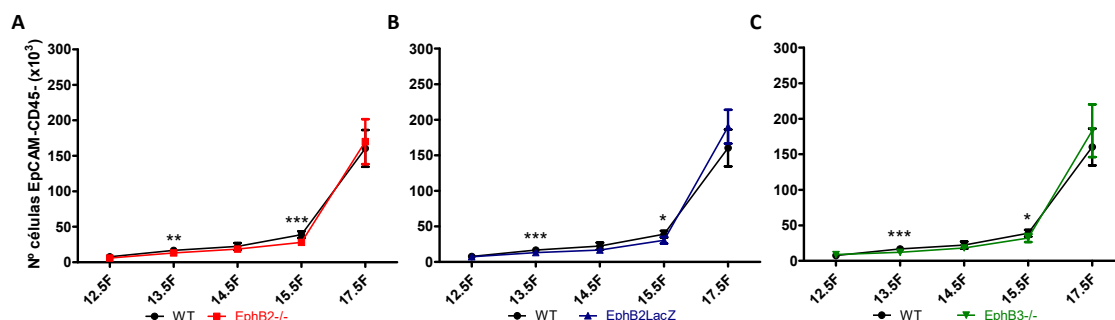


Figura 26. Análisis comparado de la evolución del número de células EpCAM⁺CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y EphB2^{-/-}, WT y EphB2LacZ y WT y EphB3^{-/-}. (A) Los timos EphB2^{-/-} presentan un número menor de células mesenquimales desde 13.5F respecto a los timos WT, con diferencias significativas sólo a 13.5F y 15.5F. Igual resultado se observa en timos EphB2LacZ (B) y EphB3^{-/-} (C) pero con valores ligeramente superiores a 17.5F, respecto a los timos WT, aunque no significativamente. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

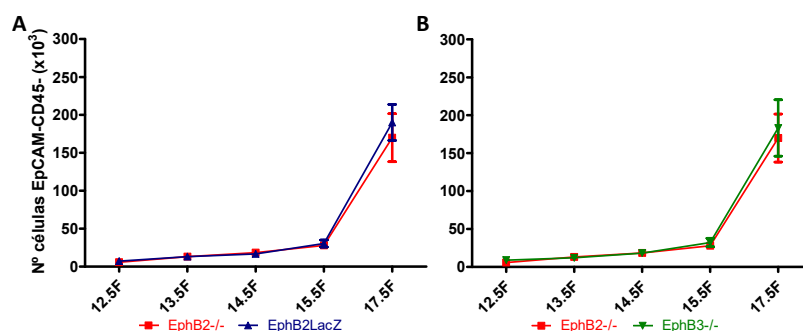


Figura 27. Estudio comparado del número de células EpCAM⁺CD45⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. No hay diferencias significativas entre los valores observados en los tres mutantes estudiados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio.

Por último, aunque habíamos visto cómo el número de timocitos (EpCAM⁺CD45⁺) y el de células epiteliales (EpCAM⁺CD45⁻) aumentaba durante la ontogenia tanto en timos WT como mutantes, calculamos el ratio EpCAM⁺CD45⁺/EpCAM⁺CD45⁻ para saber si la relación de timocitos y células epiteliales se mantenía igual en los timos WT que en los mutantes a lo largo de la maduración o si seguían desarrollos asimétricos, independientes. Se utilizaron en este caso los valores de la fracción R4 (EpCAM⁺CD45⁺) para definir los timocitos, mostrada en la **Figura 15** que eran equivalentes a los recogidos en la **Figura 4** donde se representaban como células CD45⁺ (R2). En ambos casos, el ratio incrementó significativamente entre cada estadio analizado (**Fig. 28**).

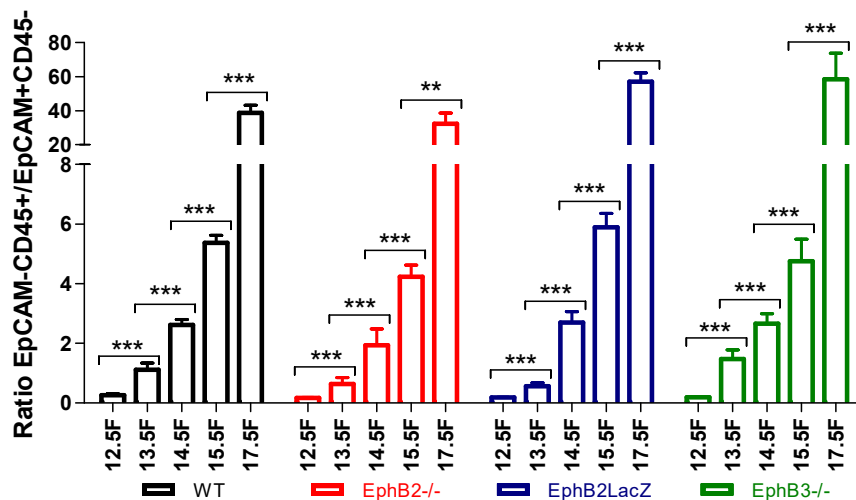


Figura 28. Evolución del ratio EpCAM⁻CD45⁺/EpCAM⁺CD45⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las gráficas muestran como el ratio aumenta conforme avanza el desarrollo fetal en todos los timos analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio respecto del anterior y se indica como: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Al comparar los valores mutantes respecto a los WT se observó, no obstante, que los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 29A**), EphB2LacZ (**Fig. 29B**) y EphB3^{-/-} (**Fig. 29C**) presentaban un ratio significativamente menor a 12.5F. A partir de aquí los tres mutantes evolucionaban de manera diferente: EphB2^{-/-} mantenía siempre los ratios más bajos que los timos WT, mientras que EphB3^{-/-} superaba los valores control a 13.5F y luego se igualaban a ellos, en el caso de EphB2LacZ eran menores a 13.5F pero los superaban significativamente a 15.5F y 17.5F. Este comportamiento se debe principalmente a que los timos WT tienen más células linfoides en general (**Fig. 10**), y los mutantes menos células epiteliales (**Fig. 20**). Al comparar el ratio entre los ratones mutantes EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (**Fig. 30A**) observábamos que los ratones deficientes para EphB2, presentaban un ratio significativamente menor respecto a los valores EphB2LacZ a partir de 14.5F, y justo hasta este estadio respecto a los timos EphB3^{-/-} (**Fig. 30B**). Aquí (14.5F), los timos mutantes, como ya hemos descrito, contienen aproximadamente el mismo número de células linfoides (**Fig. 11**) y los timos EphB2^{-/-} presentan más TECs que los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-} (**Fig. 21**), lo que explicaría el menor ratio de los timos EphB2^{-/-}.

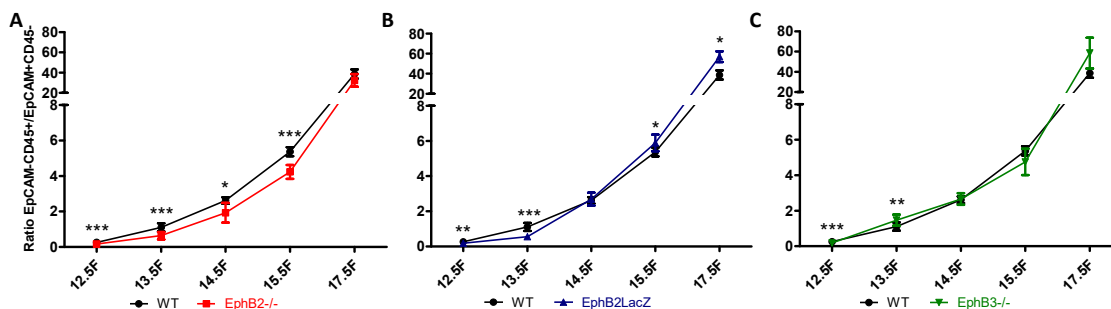


Figura 29. Análisis comparado de la evolución del ratio $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^+/\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos WT y $\text{EphB2}^{-/-}$, WT y EphB2LacZ y WT y $\text{EphB3}^{-/-}$. (A) Los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ presentan un ratio significativamente menor desde 12.5F y hasta 15.5F respecto a los WT. (B) Los timos EphB2LacZ tienen menor ratio a 12.5F y 13.5F, pero mayor a 15.5F y 17.5F respecto a los WT. (C) Los timos $\text{EphB3}^{-/-}$ sólo muestran un ratio significativamente menor a 12.5F que se hace mayor a 13.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores observados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.**

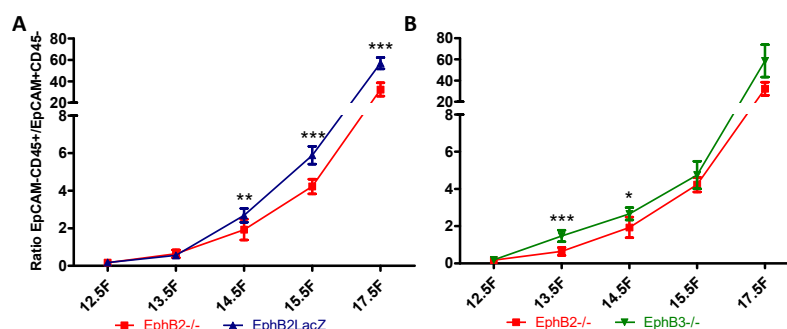


Figura 30. Estudio comparado de la evolución del ratio $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^+/\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos $\text{EphB2}^{-/-}$ vs EphB2LacZ y $\text{EphB2}^{-/-}$ vs $\text{EphB3}^{-/-}$. (A) Los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ presentan un ratio significativamente menor que los timos EphB2LacZ desde 14.5F. (B) Los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ tienen menor ratio desde 13.5F respecto a los timos $\text{EphB3}^{-/-}$, pero sólo de forma significativa en los estadios más tempranos (13.5F y 14.5F). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.**

1.2. Evolución de la población epitelial tímica inmadura $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+$

Como hemos indicado los timos deficientes en EphB mostraban cambios en la celularidad tímica total, y en las proporciones y números absolutos de las poblaciones linfoides y epiteliales. A continuación, analizamos si los defectos observados en la maduración epitelial afectaban a las poblaciones más inmaduras y si tales defectos aparecían ya en estadios tempranos del desarrollo.

Nuestro análisis de la población epitelial se centró, inicialmente, en el estudio de una población inmadura definida por la expresión del marcador MTS20 (células $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+$) (**Fig. 31**). Este marcador, junto a MTS24, ha sido utilizado para definir una población epitelial inmadura $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+$ (MTS20^+) (*Bennett y cols., 2002*), que en un principio se consideró que incluía progenitores epiteliales bipotentes capaces de dar lugar al epitelio cortical y al medular, y que da lugar a células $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^-$ (MTS20^-) (*Depreter y cols., 2008*). Resultados previos de inmunofluorescencia sobre criocortes indicaban que la población MTS20^+ parecía incrementar en los timos $\text{EphB2}^-/-$ y $\text{EphB3}^-/-$ desde 13.5F (*García-Ceca y cols., 2009a*), pero no había un verdadero estudio cuantitativo que confirmara tales resultados.

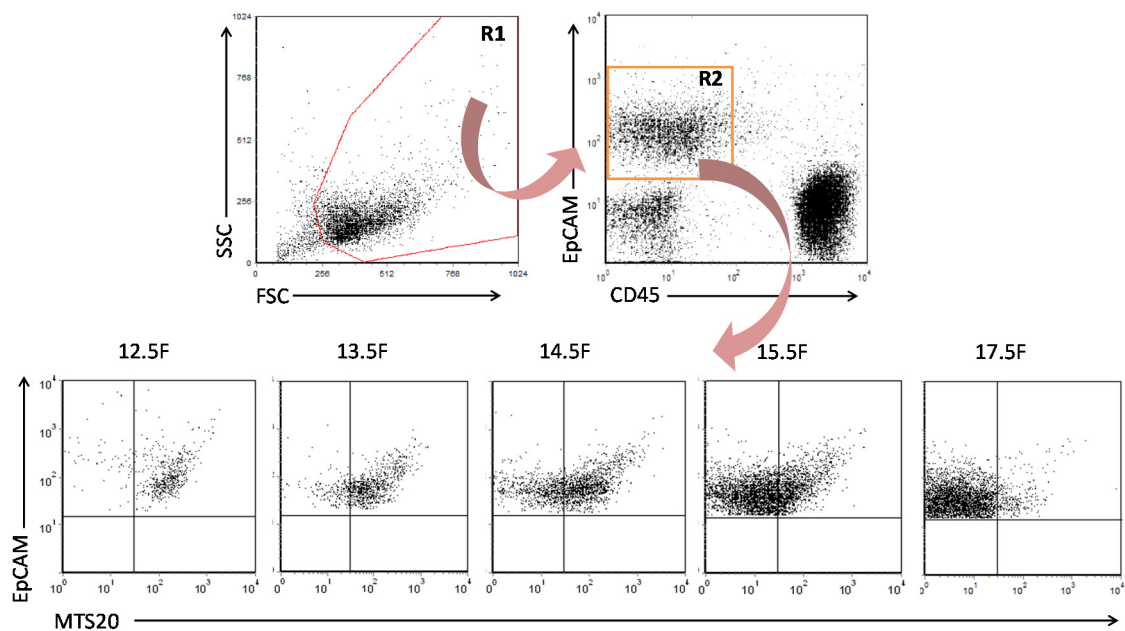


Figura 31. Identificación y evolución de las poblaciones epiteliales tímicas MTS20^+ y MTS20^- durante el desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) en timos WT. Se delimitó la población tímica total (R1) según el dot plot de tamaño y complejidad (FSC-SSC) a partir del cual se identificó la población epitelial $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$ (R2). Dentro de las TECs se analizaron las dos poblaciones en base al marcador MTS20. Los dot plots son representativos de los fetos analizados.

El estudio por citometría de flujo aquí realizado mostraba, al igual que se había descrito utilizando el marcador MTS24 (*Rossi y cols., 2007*), que la proporción de células MTS20^+ (**Fig. 31** y **Fig. 32A**, línea continua) constituía a 12.5F la práctica totalidad de las células epiteliales del primordio tímico, disminuyendo significativa y gradualmente en los siguientes estadios hasta 17.5F (**Fig. 32A**). El descenso en el porcentaje de esta población correlacionaba, naturalmente, con un incremento significativo en la proporción de células MTS20^- (**Fig. 31** y **Fig. 32A**, línea discontinua).

La evolución de ambas poblaciones (MTS20⁺, MTS20⁻) en los timos deficientes para EphB2, EphB2LacZ y EphB3 (**Fig. 32B, C, D**) seguía la misma cinética a partir de 13.5F, pero no antes. Así, entre 12.5F y 13.5F no se producía un descenso significativo en la población MTS20⁺ y en consecuencia, el incremento de la población MTS20⁻ observado en el timo de animales WT, si no que más bien, la primera población aumentaba, aunque no significativamente, y la segunda se reducía (**Fig. 32B, C, D**).

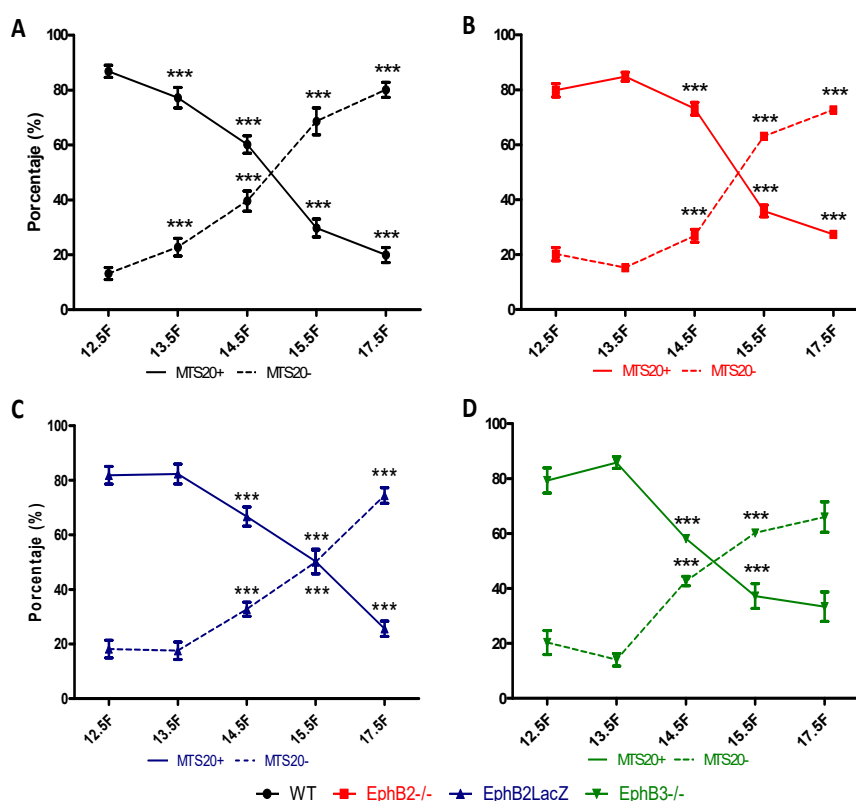


Figura 32. Evolución de los porcentajes de las poblaciones MTS20⁺ y MTS20⁻ en timos WT (A), EphB2^{-/-} (B), EphB2LacZ (C) y EphB3^{-/-} (D) a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran como la población MTS20⁺ (línea continua) disminuye gradualmente conforme avanza el desarrollo desde 13.5F en todos los timos, aunque en los WT, pero no en los mutantes, lo hace ya desde 12.5F. Lógicamente, la población MTS20⁻ (línea discontinua) evoluciona de forma inversa a la MTS20⁺. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estado con respecto al anterior para cada una de las subpoblaciones y se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

De hecho, al comparar los valores mutantes con los del epitelio WT a 12.5F (**Fig. 33A, B, C**), observábamos que la proporción de células MTS20⁺ en todos era significativamente menor, correlacionándose con un porcentaje significativamente mayor de células MTS20⁻ (**Fig. 34A, B, C**). Sin embargo, a partir de 13.5F, el porcentaje de células MTS20⁺ era significativamente mayor en todos los estadios analizados en los

timos mutantes (**Fig. 33A, B, C**). Solamente en ratones EphB3^{-/-} de 14.5F, las diferencias no eran significativas. Estos resultados indicarían un retraso en la aparición y/o maduración de las células epiteliales inmaduras a 12.5F, que se traduciría en un incremento de sus proporciones en los estadios posteriores, afectando la aparición de células MTS20⁻.

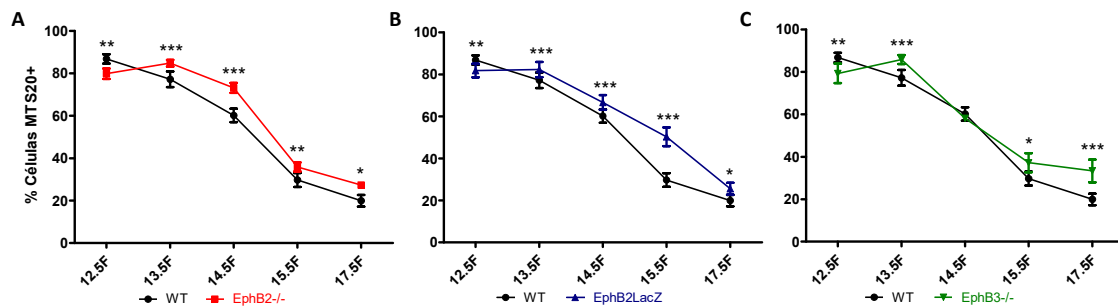


Figura 33. Análisis comparado de la evolución en los porcentajes de la población epitelial MTS20⁺ entre timos WT y EphB2^{-/-} (A), WT y EphB2LacZ (B) y WT y EphB3^{-/-} (C) a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Los timos EphB2^{-/-} (A) y EphB2LacZ (B) presentan un porcentaje significativamente menor de células MTS20⁺ a 12.5F y mayor desde 13.5F respecto a los WT. Los timos EphB3^{-/-} (C) se comportan como los EphB2^{-/-} y EphB2LacZ excepto a 14.5F, donde los porcentajes son iguales a los WT. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores indicados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.005 según el análisis estadístico de la t de Student.

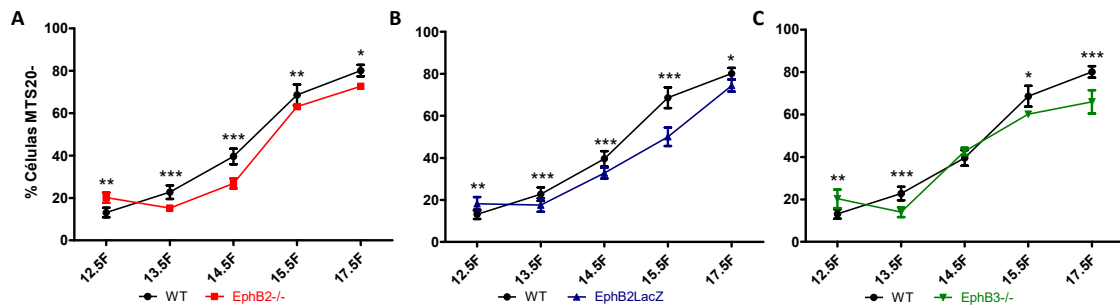


Figura 34. Análisis comparado de la evolución de los porcentajes de la población epitelial MTS20⁻ entre timos WT y EphB2^{-/-} (A), WT y EphB2LacZ (B) y WT y EphB3^{-/-} (C) a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Los timos EphB2^{-/-} (A) y EphB2LacZ (B) presentan un porcentaje significativamente mayor de células MTS20⁻ a 12.5F y menor desde 13.5F respecto a los WT. Los timos EphB3^{-/-} (C) se comportan como los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ excepto a 14.5F, donde los porcentajes son iguales al de los WT. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores indicados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.005 según el análisis estadístico de la t de Student.

Cuando se comparó el porcentaje de células MTS20⁺ y MTS20⁻ entre timos deficientes en EphB2 vs EphB2LacZ (**Fig. 35A, C**) y EphB2 vs EphB3 (**Fig. 35B, D**), se observaron de nuevo, ligeras diferencias en estadios puntuales del desarrollo que, globalmente, apuntaban que el retraso en la maduración de las células MTS20⁺ era más severo en los timos EphB2^{-/-}.

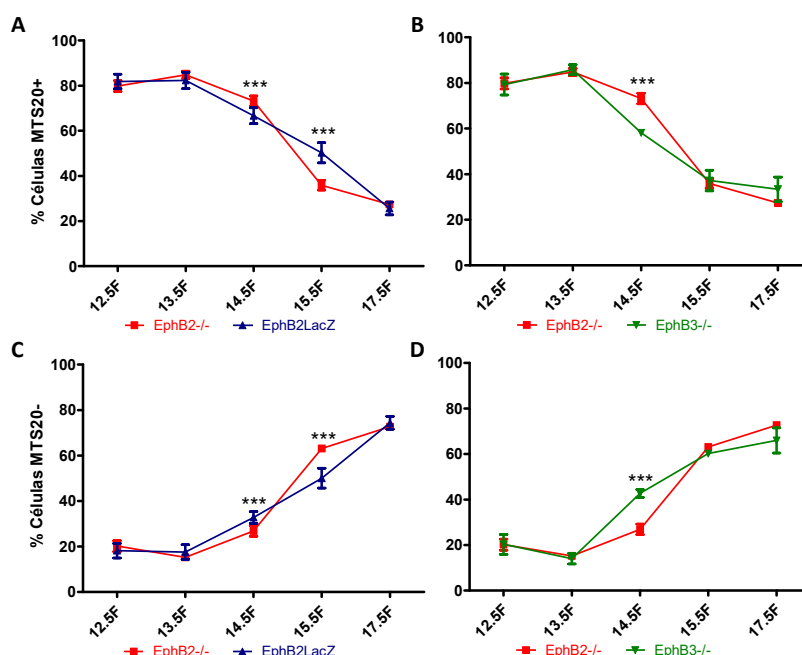


Figura 35. Análisis comparado de la evolución de los porcentajes de las poblaciones epiteliales MTS20⁺ (A, B) y MTS20⁻ (C, D) a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (A, C) y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (B, D). Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor de células MTS20⁺ a 14.5F respecto de los timos EphB2LacZ (A) y EphB3^{-/-} (B) y menor a 15.5F respecto de los primeros (A). Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células MTS20⁻ a 14.5F respecto de los timos EphB2LacZ (C) y EphB3^{-/-} (D) y un porcentaje significativamente mayor a 15.5F respecto a los primeros (C). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores indicados se indica como: * $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.**

En términos absolutos la población WT MTS20⁺, calculada respecto al número total de células tímicas (**Fig. 36A**, línea continua) sufría un ligero y gradual aumento significativo a partir de 14.5F; por el contrario, el crecimiento de la población MTS20⁻ era significativo desde el primer estadio estudiado, aumentando exponencialmente a partir de 14.5F (**Fig. 36A**, línea discontinua). Dentro de la población MTS20⁺, el número de células incrementaba ligera y gradualmente hasta 14.5F para luego caer en el caso de los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 36B**), o mantenerse en los timos EphB3^{-/-} (**Fig. 36D**). En el caso de los timos EphB2LacZ (**Fig. 36C**), el incremento se mantenía hasta 14.5F-15.5F y finalmente caía. Las poblaciones MTS20⁻ incrementan en todos los timos mutantes entre 13.5F-14.5F, pero no antes, cayendo en el caso de EphB3^{-/-} (**Fig. 36D**) entre 15.5F-17.5F, aunque no significativamente. Por el contrario, en los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 36B**) aunque aumentaba entre 15.5F y 17.5F lo hacía de manera ligera y tampoco significativamente, mientras que en los timos EphB2LacZ (**Fig. 36C**), el patrón se

parece, aún con valores menores, al de los WT a partir de 14.5F en que gradualmente aumentaba en todos los estadios estudiados.

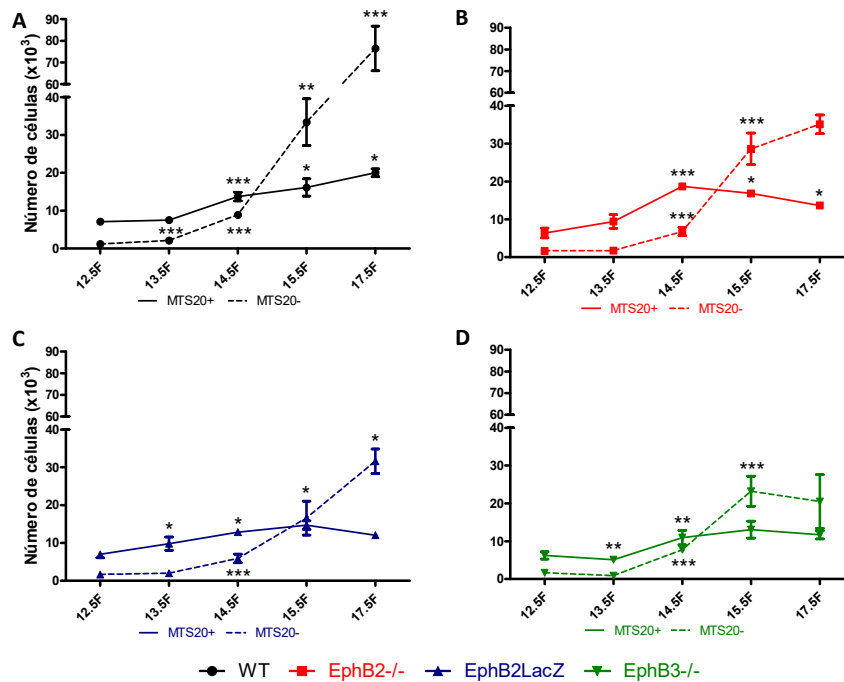


Figura 36. Evolución del número de células epiteliales MTS20⁺ y MTS20⁻ en timos WT (A), EphB2^{-/-} (B), EphB2LacZ (C) y EphB3^{-/-} (D) a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran como la población MTS20⁺ (línea continua) aumenta conforme avanza el desarrollo desde 13.5F en todos los timos, aunque en los WT lo sigue haciendo hasta 17.5F y en los mutantes a partir de 14.5F en el caso de EphB2^{-/-} (B) y de 15.5F en el de EphB2LacZ (C) o EphB3^{-/-} (D) comienzan a caer o se mantienen. En cambio, la población MTS20⁻ (línea discontinua) incrementa en los timos WT desde 13.5F, y más bruscamente a partir de 14.5F, mientras en los timos mutantes el incremento es menor, llegando hasta 17.5F en los timos EphB2LacZ, y hasta 15.5F en EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se refiere a un estadio con respecto al anterior para cada una de las subpoblaciones y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Al comparar los valores absolutos mutantes con los WT para cada una de las poblaciones, observábamos que no había diferencias significativas a 12.5F entre ellos, aunque los valores son menores en los mutantes, porque en porcentaje lo son significativamente (ver Fig. 33) aunque el número total de células epiteliales EpCAM⁺CD45⁻ no (ver Fig. 20). En los timos EphB2^{-/-} (Fig. 37A) los valores eran significativamente mayores a 13.5F y 14.5F, para descender significativamente a 17.5F, tal y como hemos visto ya en el número de células epiteliales EpCAM⁺CD45⁻ (ver Fig. 20) y en el de células tímicas totales (ver Fig. 2). En los timos EphB2LacZ (Fig. 37B), las diferencias eran mucho menores y el número de células MTS20⁺ era significativamente

mayor sólo a 13.5F y menor a 17.5F. Los timos EphB3^{-/-} (**Fig. 37C**) presentaban un número absoluto de células inmaduras menor en todos los estadios, posiblemente debido a la menor celularidad epitelial existente en estos ratones desde 13.5F. En resumen, el menor número de células tímicas totales y epiteliales en los timos mutantes explica estos resultados algo relacionados con el ciclo y la muerte de las células mutantes como luego describiremos. En el caso de la población MTS20⁺ (**Fig. 38A, B, C**), todos los mutantes mostraban valores significativamente menores respecto a los valores WT desde 13.5F, que en los últimos estadios se mantenían o incluso disminuían como ya habíamos indicado (**Fig. 36**), demostrando un retraso en la aparición de las células más maduras. Curiosamente a 12.5F, la población MTS20⁺ (**Fig. 38**) está significativamente aumentada en los timos mutantes, lo que podría indicar que se trata de células aún más inmaduras que no han diferenciado el marcador, más que de células que lo han regulado negativamente ya, lo que explicaría también el menor porcentaje de células MTS20⁺ de los timos mutantes a 12.5F (**ver Fig. 33**).

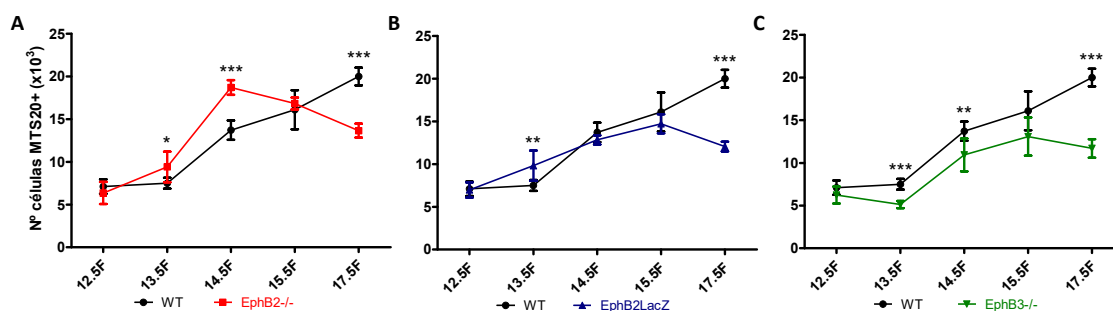


Figura 37. Análisis comparado de la evolución del número de células epiteliales MTS20⁺ entre timos WT y EphB2^{-/-} (A), WT y EphB2LacZ (B) y WT y EphB3^{-/-} (C) durante el desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Los timos EphB2^{-/-} (A) presentan un número significativamente mayor de estas células entre 13.5F y 14.5F, mientras que a 17.5F su número es menor respecto a los valores WT. Los timos EphB2LacZ (B) presentan un número significativamente mayor de células MTS20⁺ a 13.5F, pero menor a 17.5F respecto a los WT. Los timos EphB3^{-/-} (C) muestran menor número desde 13.5F respecto a los timos WT. Todos los mutantes tienen un menor número de células MTS20⁺ respecto a los timos WT a 12.5F, pero las diferencias no son significativas. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores indicados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Al comparar el número de células MTS20⁺ entre mutantes (**Fig. 39**), comprobamos que los timos EphB2^{-/-} tenían mayor número de células MTS20⁺ a 14.5F que los EphB2LacZ (**Fig. 39A**) y desde 13.5F hasta 15.5F al comparar con los EphB3^{-/-} (**Fig. 39B**), correlacionándose con el mayor número de células epiteliales totales observadas en los timos EphB2^{-/-} (**ver Fig. 21**) y con la acumulación de células MTS20⁺ que diferencian

más lentamente en estos mutantes. Cuando se comparó el número de células MTS20⁻ entre los timos deficientes en EphB2 vs EphB2LacZ (**Fig. 40A**), los timos EphB2^{-/-} presentaban un mayor número de estas células con valores significativos a 15.5F; y al comparar con EphB3^{-/-} (**Fig. 40B**), de nuevo los timos EphB2^{-/-} presentaban mayor número de células a 13.5F, 15.5F y 17.5F, pero las diferencias sólo eran significativas a 13.5F.

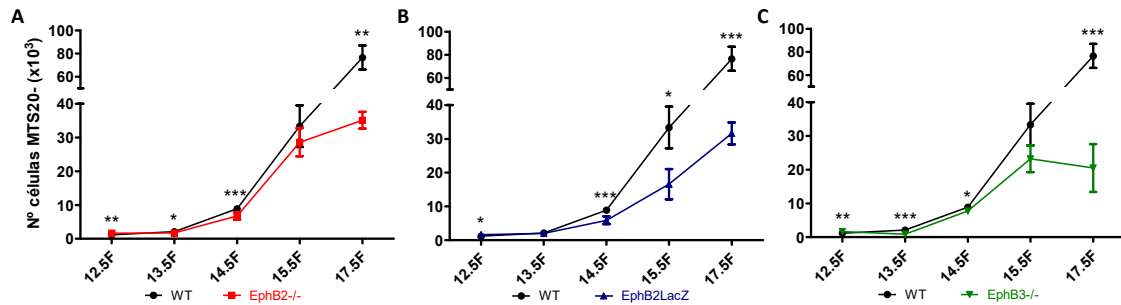


Figura 38. Análisis comparado de la evolución del número de células epiteliales MTS20⁻ entre timos WT y EphB2^{-/-} (A), WT y EphB2LacZ (B) y WT y EphB3^{-/-} (C) durante el desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Todos los timos mutantes presentan menor número de células MTS20⁻ desde 13.5F respecto a los timos WT. Por el contrario, a 12.5F los valores más altos corresponden a los timos mutantes. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores indicados se obtuvo al comparar los valores WT y mutantes en cada estadio y se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

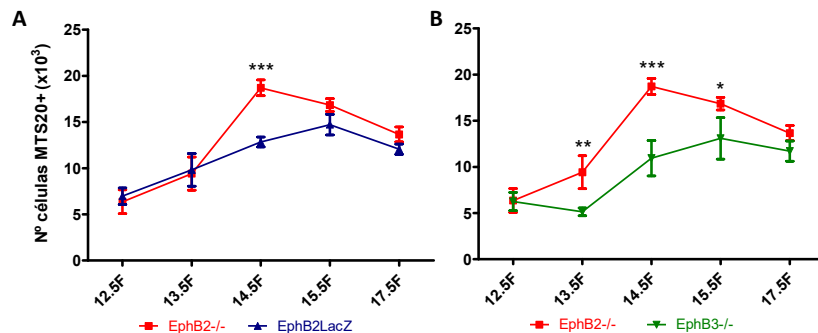


Figura 39. Análisis comparado de la evolución del número de células epiteliales MTS20⁺ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (A) y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (B). Los timos EphB2^{-/-} (A) presentan mayor número de células MTS20⁺ desde 14.5F respecto de los timos EphB2LacZ, pero los valores sólo son estadísticamente significativos en ese estadio; y desde 13.5F respecto de los EphB3^{-/-}, pero no a 17.5F (B). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores indicados se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

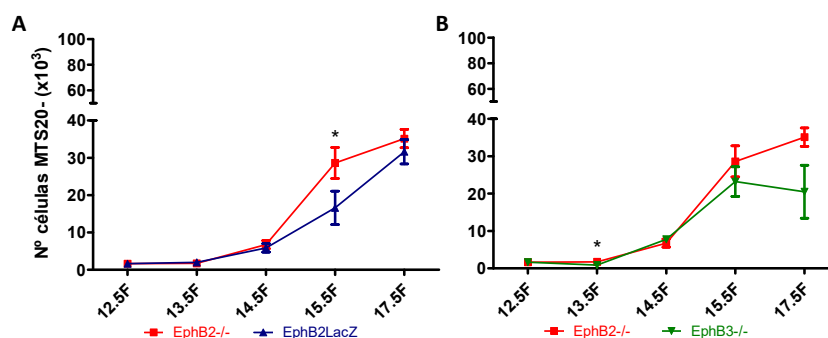


Figura 40. Análisis comparado de la evolución de la celularidad MTS20⁻ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (A) y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (B). Los timos EphB2^{-/-} (A) presentan un número significativamente mayor de células MTS20⁻ sólo a 15.5F respecto de los timos EphB2LacZ; en cambio, respecto de los valores EphB3^{-/-} son más altos en varios estadios pero de manera significativa sólo a 13.5F (B). Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la t de Student.

En resumen, nuestros resultados muestran un claro retraso en la aparición de las células MTS20⁻ que se correlaciona con un incremento en la proporción de células MTS20⁺ en los timos deficientes en EphB, con especial relevancia en el caso de los EphB2^{-/-} y sugieren que ese retraso aparece ya a 12.5F. En este estadio, los valores MTS20⁻ reflejan la existencia de una población primitiva que no expresa todavía el marcador MTS20.

1.3. Evolución de las poblaciones epiteliales tímicas definidas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1

Los resultados descritos anteriormente sugerían un retraso en la aparición de células maduras MTS20⁻ a partir de la población inmadura MTS20⁺ en los timos fetales de ratones mutantes. Como la población MTS20⁻ es una población heterogénea que entre 15.5F-17.5F constituye la mayoría de las células epiteliales EpCAM⁺, quisimos conocer con que poblaciones epiteliales maduras concretas estaba asociado el menor porcentaje de células MTS20⁻. Para ello analizamos inicialmente la expresión de otros marcadores epiteliales como son Ly51 y UEA1 (*Ulex europaeus lectin agglutinin 1*), que tradicionalmente han sido utilizados para identificar en el timo, tanto fetal como adulto, las dos principales poblaciones epiteliales que constituyen el estroma epitelial del órgano: la cortical (Ly51⁺UEA1⁻) y la medular (Ly51⁻UEA1⁺) (Seach y cols., 2012).

Estudiamos, por tanto, dentro de la población epitelial total ($\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$) la cinética de aparición y la evolución de las diferentes poblaciones epiteliales definidas por los marcadores Ly51 y UEA1 en el timo de animales WT y deficientes en las distintas EphB en estudio. El análisis se realizó entre los estadios 12.5F-17.5F y a 7 días de desarrollo postnatal (7PN), para analizar mejor en este último caso el desarrollo final de la población medular UEA1 que ocurre básicamente después del nacimiento (*Dumont-Lagace y cols., 2014*).

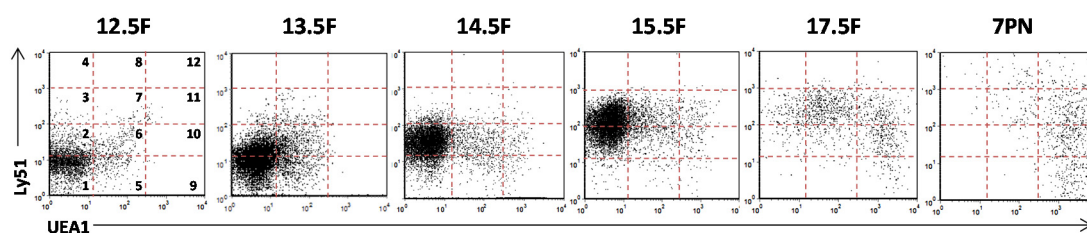


Figura 41. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 durante el desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) y a 7PN en timos WT. Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales dentro de la población $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$ en los timos WT según el nivel de expresión del marcador cortical Ly51 y el medular UEA1. Tal y como muestran los *dot plots* a lo largo del desarrollo se pueden definir las siguientes subpoblaciones: 1= $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$, 2= $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^-$, 3= $\text{Ly51}^{\text{med}}\text{UEA1}^-$, 4= $\text{Ly51}^{\text{hi}}\text{UEA1}^-$, 5= $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$, 6= $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$, 7= $\text{Ly51}^{\text{med}}\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$, 8= $\text{Ly51}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$, 9= $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^{\text{hi}}$, 10= $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^{\text{hi}}$, 11= $\text{Ly51}^{\text{med}}\text{UEA1}^{\text{hi}}$ y 12= $\text{Ly51}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{hi}}$. Nótese como la proporción relativa de cada una de las subpoblaciones varía dependiendo del estadio analizado y como la regulación de la expresión de Ly51 sucede antes que la de UEA1. Los *dot plots* son representativos de los distintos fetos analizados para cada estadio.

Tal y como se muestra en la **Figura 41**, en el timo de los animales WT, la aparición de los marcadores Ly51 y UEA1 varía a lo largo del tiempo, de manera que se pueden definir diferentes subpoblaciones en base a los niveles de expresión de las moléculas. De acuerdo a la expresión de Ly51 pueden definirse subpoblaciones negativas (-) (1, 5, 9), *low* (lo) (2, 6, 10), *medium* (med) (3, 7, 11) y *high* (hi) (4, 8, 12), y para UEA1, negativas (-) (1-4), *low/medium* (lo/med) (5-8) y *high* (hi) (9-12). Así, a 12.5F (**Fig. 41**) la principal población epitelial es $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ (1), considerándose la población más inmadura por no expresar ninguno de los dos marcadores. Hay también una pequeña proporción de células $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^-$ (2) y $\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$ (6), así como algunas células $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$ (5). Conforme avanza el desarrollo, como consecuencia de la regulación positiva de Ly51, la población más primitiva $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ va desapareciendo siendo prácticamente inexistente a 15.5F (**Fig. 41**) y se expande (13.5F) la población $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^-$ (2), que constituye a 14.5F la inmensa mayoría de las células epiteliales tímicas. En los siguientes días (15.5F y 17.5F) continúa la regulación positiva de la

expresión de Ly51 y la mayoría de la población se hace Ly51^{med}, algo que también sucede con la expresión de UEA1, estableciéndose tres subpoblaciones, la mayoritaria a 17.5F Ly51^{med}UEA1^{lo/med} (7), otra Ly51^{lo}UEA1^{hi} (10) y otra Ly51^{med}UEA1^{hi} (11). A 7PN, esta tendencia se confirma y se apreciaba una población UEA1^{hi} que contenía algunas células Ly51^{hi} (12), siendo la mayoría Ly51^{med} (11), Ly51^{lo} (10) o Ly51⁻ (9). Sólo unas pocas células eran Ly51^{hi}UEA1^{lo/med} (8).

En las representaciones de la **Figura 42**, pueden verse también la evolución de todas estas poblaciones epiteliales. En la gráfica **A**, se observa la caída gradual de la población Ly51⁻UEA1⁻, muy mayoritaria a 12.5F pero que prácticamente desaparece a partir de 15.5F. En relación con ello, las distintas poblaciones que van regulando positivamente Ly51 y UEA1 van aumentando a lo largo del desarrollo tímico: Ly51^{lo}UEA1⁻ aumentaba hasta el día 14.5F y ahí empezaban a disminuir hasta casi desaparecer a 17.5F, en correlación con el aumento de la expresión de Ly51 que, a partir de 14.5F, incrementa considerablemente el porcentaje de células Ly51^{med}UEA1⁻ que comienzan a caer a 15.5F para dejar paso a una mínima población Ly51^{hi}UEA1⁻ a 17.5F y 7PN. El porcentaje de células UEA1^{lo/med} es muy bajo a lo largo de todo el proceso salvo en el caso de las células Ly51^{med}UEA1^{lo/med} que tiene una repentina subida a 17.5F para caer de nuevo a 7PN (**B**). El comportamiento de esta población refleja, por un lado, la tardía aparición del marcador (**B**) y, por otro, su rápida regulación (**C**), de manera que a partir de 13.5F comienza a aumentar la población Ly51⁻UEA1^{hi} con un brusco incremento entre 17.5F y 7PN; las poblaciones Ly51^{lo}UEA1^{hi} y Ly51^{med}UEA1^{hi} son prácticamente inapreciables hasta 15.5F, incrementando entonces bruscamente. Finalmente, a partir de 17.5F hay un pequeño y gradual aumento de la población Ly51^{hi}UEA1^{hi}. Podríamos describir, por tanto, dos etapas durante el desarrollo WT en función de la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1: una etapa inicial hasta 17.5F donde se produce fundamentalmente la regulación del marcador Ly51 que coincide con la expansión del epitelio cortical, y una segunda etapa a partir de 15.5F-17.5F cuando comienzan a aparecer las células que expresan UEA1^{lo/med} y UEA1^{hi}. Por consiguiente, al final del desarrollo fetal y, sobre todo, en el periodo postnatal el marcador medular predomina sobre el cortical (*Dumont-Lagace y cols., 2014*).

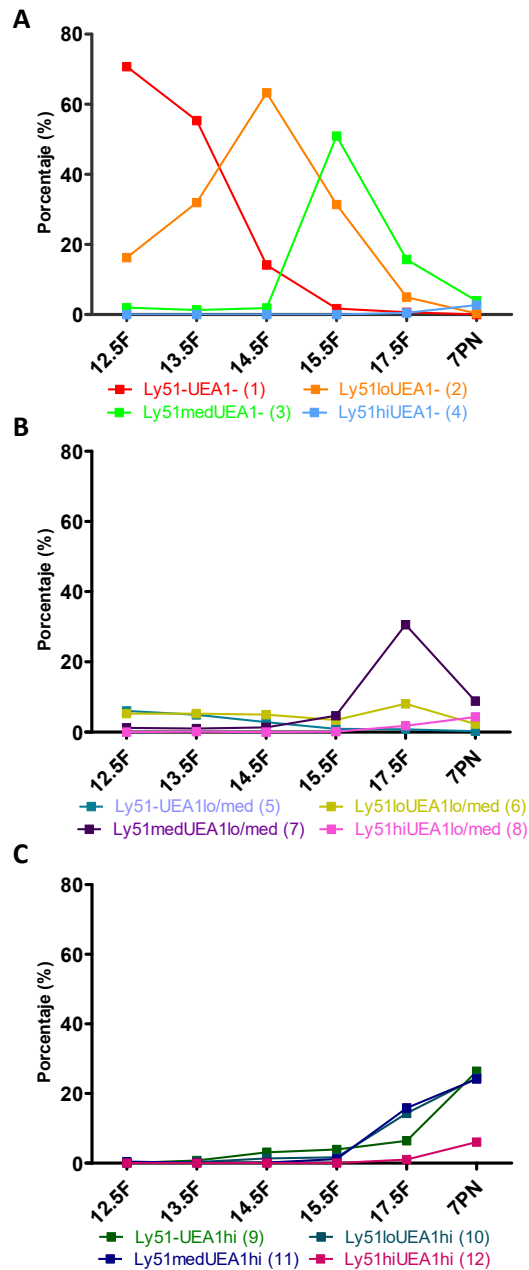


Figura 42. Evolución de las subpoblaciones epiteliales Ly51 en relación a la expresión de UEA1 en timos WT durante el desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) y 7PN. Las gráficas muestran, dentro de la población EpCAM⁺CD45⁺, la evolución de las distintas subpoblaciones Ly51 en base a la expresión diferencial de UEA1: UEA1⁻ (A), UEA1^{lo/med} (B) y UEA1^{hi} (C). Tal y como se observa en las gráficas (A) la expresión de Ly51 aparece antes que la de UEA1; las población Ly51^{lo} y Ly51^{med} incrementan hasta 15.5F. A partir de ese estadio aparecen células Ly51^{med}UEA1^{lo/med} (B) y a partir de 17.5F aparecen las poblaciones UEA1^{hi} con diferentes niveles de expresión para Ly51 (C).

El proceso de maduración de las subpoblaciones definidas por Ly51 y UEA1 en los ratones WT permite distinguir, por tanto, distintos estadios (Fig. 42). A la hora de comparar el patrón WT con el observado en los ratones mutantes nos centraremos en los siguientes aspectos:

1) La evolución temprana de la población $\text{Ly51}^{\text{hi}}\text{UEA1}^+$ que desaparece gradualmente entre 12.5F y 15.5F, en correlación con la de $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^+$ que aumenta hasta 14.5F y después comienza también a desaparecer hasta 17.5F.

2) La aparición de las poblaciones intermedias $\text{Ly51}^{\text{med}}\text{UEA1}^+$ entre 14.5F y 7PN y, finalmente, de la de células $\text{Ly51}^{\text{hi}}\text{UEA1}^+$ en los últimos estadios.

3) La evolución tardía de las poblaciones $\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$, especialmente aquellas que expresan Ly51^{med} y Ly51^{hi} .

4) Finalmente, la evolución de las poblaciones UEA1^{hi} (Ly51^+ , Ly51^{lo} , Ly51^{med}) a partir de 15.5F.

Hay que resaltar en este sentido que la mayoría de los autores que han realizado estudios de citometría de flujo de las subpoblaciones definidas por los marcadores Ly51 y UEA1 se han limitado a considerar dos poblaciones ($\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ y $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$) (*Dumont-Lagace y cols., 2014; Marrella y cols., 2014*); nosotros, sin embargo, también analizamos una serie de poblaciones intermedias en tránsito hacia la condición madura que creemos no se deben obviar, porque al final lo que nos interesa es la evolución de las poblaciones hasta alcanzar la condición adulta. Así, a 7PN hay poblaciones Ly51^{med} o Ly51^{hi} que expresan $\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$ y en la población medular (UEA1^{hi}) se podían encontrar células Ly51^{lo} y Ly51^{med} .

Cuando se analizaron los timos deficientes en EphB (**Fig. 43**) observábamos que la cinética de aparición de las diferentes subpoblaciones tímicas era similar a la descrita en los WT. Sin embargo, existían diferencias en el momento de aparición de algunas de ellas y en su evolución. En el caso de la población más primitiva $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$, aunque la tendencia era al descenso del porcentaje de las células mutantes a 12.5F, solamente el de timos $\text{EphB2}^{-/-}$ era significativamente menor (**Fig. 44**) lo que indicaba un menor porcentaje de progenitores inmaduros diferenciados. A partir de ese momento, las proporciones de esta población eran significativamente más altas en todos los timos mutantes (**Fig. 44**), y solamente la población EphB2LacZ mostraba valores control a 15.5F cuando esta población desaparecía (**Fig. 44**). Estos resultados indican un cierto retraso en la aparición del marcador cortical Ly51 desde 13.5F en adelante en los timos mutantes.

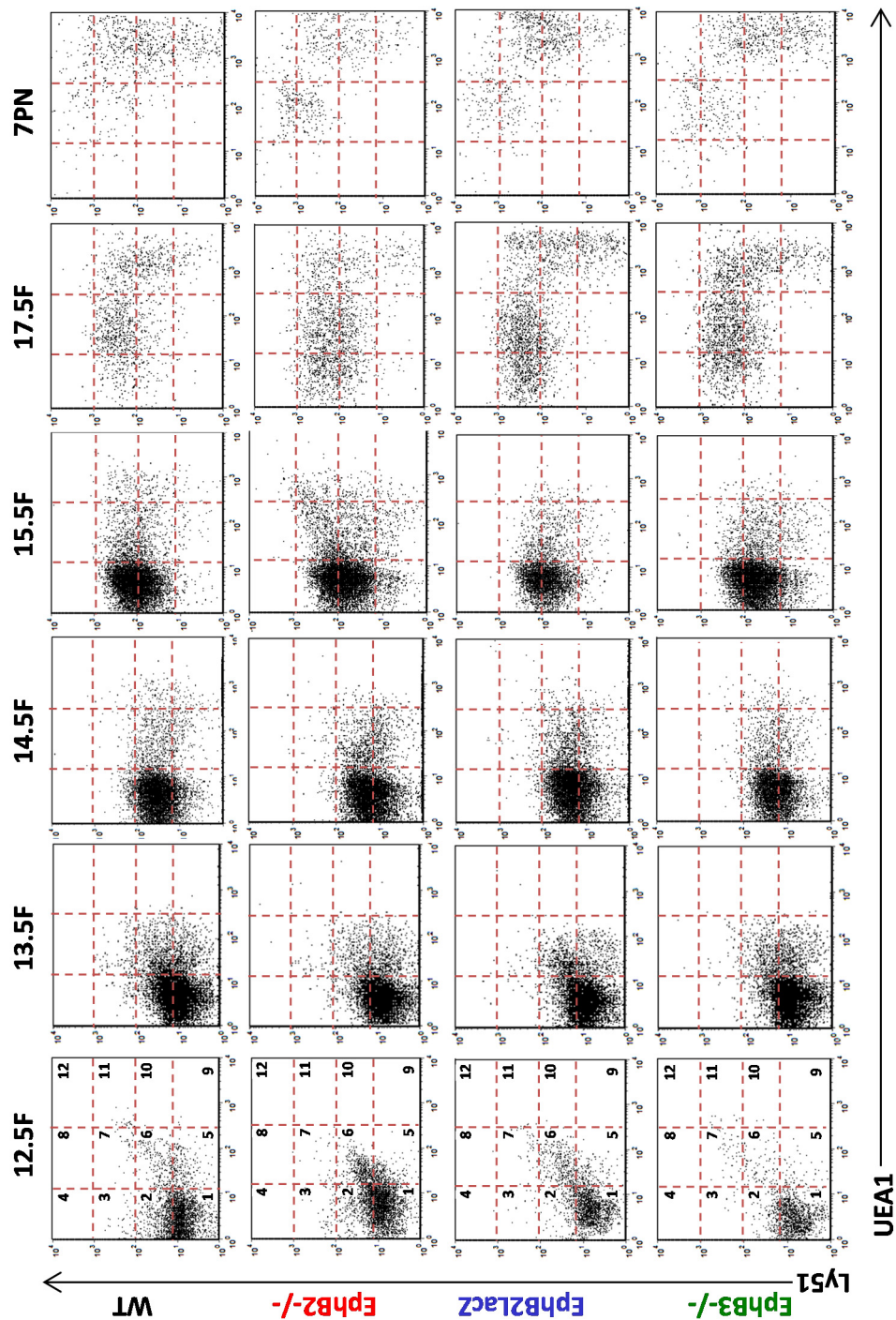


Figura 43. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 durante el desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) y a 7PN en los timos WT y deficientes en EphB. Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales dentro de la población EpCAM⁺CD45⁻ en los timos EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} en comparación a los WT, según el nivel de expresión del marcador cortical Ly51 y el medular UEA1. Tal y como se observa en los *dot plots* a lo largo del desarrollo se definen las siguientes subpoblaciones: 1=Ly51^{lo}UEA1^{hi}, 2=Ly51^{lo}UEA1^{lo/med}, 3=Ly51^{med}UEA1^{lo/med}, 4=Ly51^{hi}UEA1^{lo/med}, 5=Ly51^{lo}UEA1^{hi}, 6=Ly51^{lo}UEA1^{lo/med}, 7=Ly51^{med}UEA1^{lo/med}, 8=Ly51^{hi}UEA1^{lo/med}, 9=Ly51^{lo}UEA1^{hi}, 10=Ly51^{lo}UEA1^{hi}, 11=Ly51^{med}UEA1^{hi} y 12=Ly51^{hi}UEA1^{hi}. Nótese como el patrón de diferenciación experimentado en los timos mutantes es similar al observado en la condición WT, aunque muestra cierto retraso. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados para cada estadio.

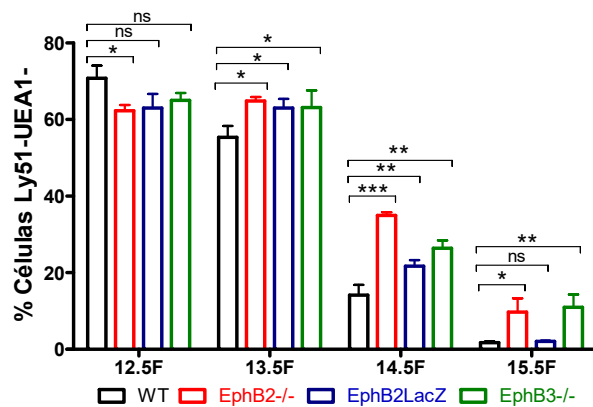


Figura 44. Evolución de la subpoblación Ly51^{lo}UEA1⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 15.5F. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación Ly51^{lo}UEA1⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como la población Ly51^{lo}UEA1⁻ en los timos WT disminuye considerablemente entre 12.5F y 15.5F, sin embargo, aunque en los timos mutantes la evolución es similar, el descenso comienza a partir de 13.5F, sin observar diferencias en los porcentajes entre 12.5F y 13.5F. En este sentido, todos los timos mutantes muestran una reducción en la proporción de estas células a 12.5F, significativa sólo en el caso de EphB2^{-/-}, pero un incremento significativo en todos ellos de las células Ly51^{lo}UEA1⁻ desde 13.5F hasta 15.5F, excepto para EphB2LacZ a 15.5F, que mostraba valores similares a los WT. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

En correlación con este resultado, a 13.5F la proporción de células Ly51^{lo}UEA1⁻ era significativamente menor en los tres mutantes y así se mantenía hasta 14.5F, excepto para los timos EphB2LacZ (**Fig. 45A**). A partir de 15.5F, las células Ly51^{lo}UEA1⁻, salvo en timos EphB2LacZ, alcanzaban valores significativamente mayores que los controles (**Fig. 45A**). En el caso de EphB2LacZ, la caída del porcentaje de células Ly51^{lo}UEA1⁻ entre 14.5F y 15.5F se debía al paso de muchas de ellas a la condición de células Ly51^{med}UEA1⁻ (**Fig. 45B**), sugiriendo un comportamiento más similar al de los ratones WT que al de los otros mutantes. En cambio, en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} el mayor porcentaje de células Ly51^{lo}UEA1⁻ a 15.5F (**Fig. 45A**) se veía reflejado en una proporción significativamente menor de células Ly51^{med}UEA1⁻ (**Fig. 45B**). Además, a 17.5F cuando la proporción de células Ly51^{med}UEA1⁻ caía en los timos WT, también lo hacía en los timos EphB2LacZ de manera similar a los WT, pero no en los EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, que mantenía valores similares entre ambos estadios. Sin embargo, el efecto observado en los tres mutantes era el mismo, produciéndose un acúmulo significativo de estas células. No obstante, como se observa en la figura, mientras los valores de EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} apenas varían entre 15.5F y 17.5F; los de EphB2LacZ sufrían una caída prácticamente igual a la observada en los valores WT (**Fig. 45B**).

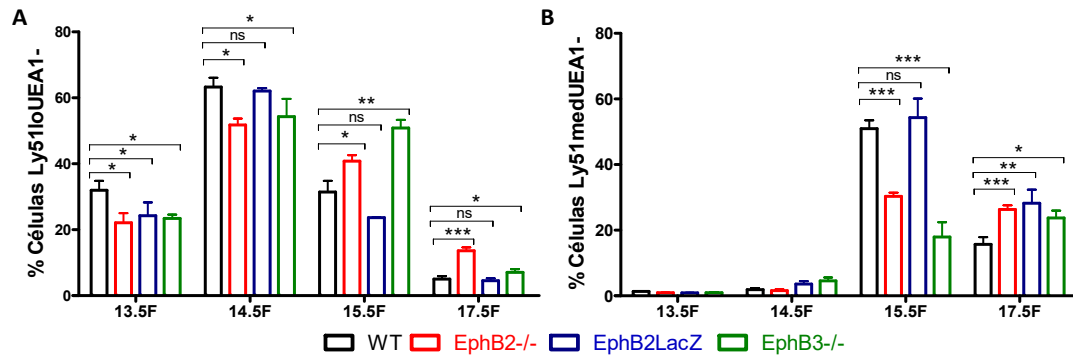


Figura 45. Evolución de las subpoblaciones Ly51^{lo}UEA1⁻ y Ly51^{med}UEA1⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 13.5F y 17.5F. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones Ly51^{lo}UEA1⁻ (A) y Ly51^{med}UEA1⁻ (B) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (A) Nótese el aumento de la proporción de células Ly51^{lo}UEA1⁻ en los timos WT entre 13.5F y 14.5F, momento a partir del cual comienzan a descender. La evolución en los timos mutantes fue similar, sin embargo, éstos presentan un porcentaje significativamente menor respecto a los WT a 13.5F y a 14.5F excepto para EphB2LacZ a 14.5F. En cambio, a partir de 15.5F sólo los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} presentan porcentajes significativamente mayores que los WT. (B) La proporción de células Ly51^{med}UEA1⁻ aumenta entre 14.5F y 15.5F en los timos WT, pero desciende a partir de este estadio. En cambio, en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} se produce un aumento de esta subpoblación entre 14.5F y 15.5F, pero no desciende a 17.5F. A 15.5F esta subpoblación es significativamente menor en estos mutantes y mayor a 17.5F al comparar con los WT. La evolución en los timos EphB2LacZ se asemeja más al patrón WT, aunque a 17.5F presenta valores significativamente mayores, al igual que el resto de mutantes. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: **p*≤0.05; ***p*≤0.01; ****p*≤0.005 según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Como hemos comentado anteriormente, durante el desarrollo temprano de los timos WT (12.5F-15.5F), ocurría principalmente la expansión del compartimento cortical que no expresaba UEA1, pero a 15.5F aparecía una nueva subpoblación Ly51^{med} que expresaba UEA1 (Ly51^{med}UEA1^{lo/med}) que se consolidaba a 17.5F para caer a 7PN (Fig. 46A). Esta población Ly51^{med}UEA1^{lo/med} estaba reducida significativamente a 17.5F en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero no en EphB2LacZ (Fig. 46A). La condición cambiaba a 7PN cuando la población caía en los timos WT, mientras que en los mutantes EphB2^{-/-} sobre todo, y en los EphB2LacZ se mantenía alta (Fig. 46A), pero no en los EphB3^{-/-}. Por otro lado, los tres mutantes mostraban en ese estadio postnatal un incremento significativo de la población Ly51^{hi}UEA1^{lo/med} (Fig. 46B), que estaba significativamente disminuida a 17.5F en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero no en los EphB2LacZ.

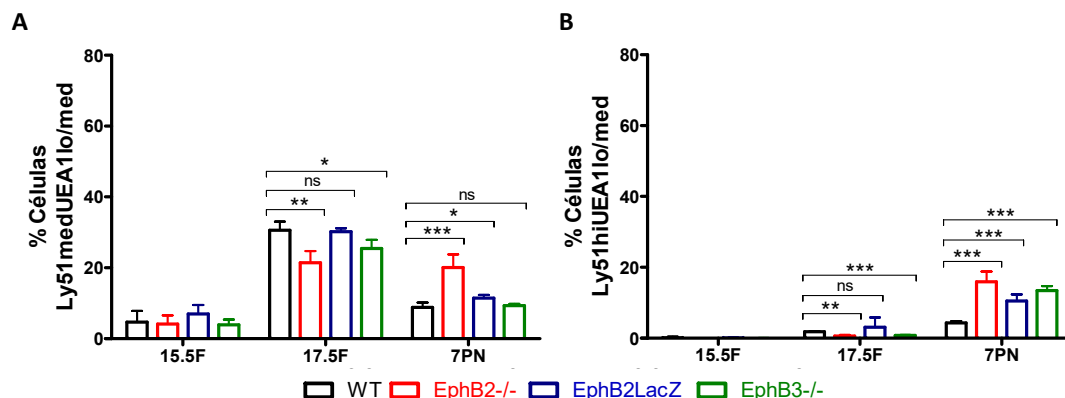


Figura 46. Evolución de las subpoblaciones epiteliales Ly51^{med}UEA1^{lo/med} y Ly51^{hi}UEA1^{lo/med} en timos WT y deficientes en EphB entre 15.5F y 7PN. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones Ly51^{med}UEA1^{lo/med} (A) y Ly51^{hi}UEA1^{lo/med} (B) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (A) Nótese el aumento de la proporción de células Ly51^{med}UEA1^{lo/med} entre 15.5F y 17.5F y el descenso hasta 7PN, tanto en los timos WT como en los mutantes. Sin embargo, los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de estas células a 17.5F respecto a los WT, mientras que a 7PN, los timos EphB2^{-/-} y los EphB2LacZ tienen un porcentaje significativamente mayor, de forma más pronunciada en los primeros. (B) Las células Ly51^{hi}UEA1^{lo/med} aparecen a 17.5F aumentando ligeramente hasta 7PN en los timos WT. Sin embargo, en los mutantes aumentan bruscamente entre 17.5F y 7PN, observándose a 17.5F un porcentaje significativamente menor de estas células sólo en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} respecto a los WT, pero una acumulación en todos a 7PN. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

En cuanto a las poblaciones definidas por el marcador medular UEA1, además, de la población Ly51^{med}UEA1^{lo/med} que acabamos de describir, a 17.5F aparecían poblaciones Ly51⁻UEA1^{hi}, Ly51^{lo}UEA1^{hi} y Ly51^{med}UEA1^{hi}. Aparentemente, la población Ly51^{med}UEA1^{lo/med} de ratones WT de 15.5F aumentaba gradualmente la expresión de UEA1 que pasaba a ser *high* en muchas células a 17.5F y en más del 80% a 7PN, mientras la expresión de Ly51 va disminuyendo generándose poblaciones Ly51⁻/loUEA1^{hi} (Fig. 43). A 17.5F, había una reducción en todos los mutantes de las poblaciones Ly51^{med}UEA1^{hi} (Fig. 47A) y Ly51^{lo}UEA1^{hi} (Fig. 47B), pero no de la población Ly51⁻UEA1^{hi} (Fig. 47C). Sin embargo, a 7PN las subpoblaciones Ly51^{med}UEA1^{hi} y Ly51^{lo}UEA1^{hi} no mostraban grandes variaciones con respecto a los WT, excepto en los timos EphB2^{-/-} donde el porcentaje de células Ly51^{lo}UEA1^{hi} (Fig. 47B) era significativamente menor, indicando el retraso en la maduración de las poblaciones medulares en estos mutantes. Sin embargo, la subpoblación medular Ly51⁻UEA1^{hi} madura, que aumentaba en los timos WT entre 17.5F y 7PN (Fig. 42C), era menor en todos los timos mutantes respecto a los valores WT (Fig. 47C), aunque más claramente en los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ.

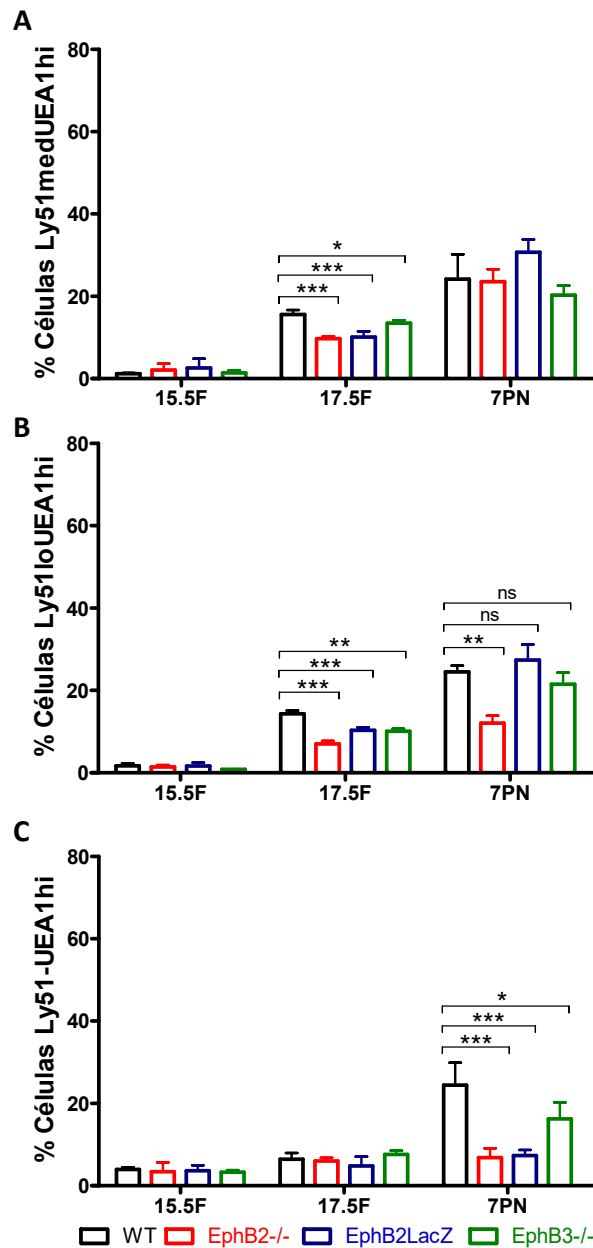


Figura 47. Evolución de las subpoblaciones epiteliales Ly51^{med}UEA1^{hi}, Ly51^{lo}UEA1^{hi} y Ly51⁻UEA1^{hi} en timos WT y deficientes en EphB entre 15.5F y 7PN. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones Ly51^{med}UEA1^{hi} (A), Ly51^{lo}UEA1^{hi} (B) y Ly51⁻UEA1^{hi} (C) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (A) Nótese el aumento de la proporción de células Ly51^{med}UEA1^{hi} entre 15.5F y 7PN en los timos WT y mutantes. Sin embargo, éstos últimos presentan porcentajes significativamente menores a 17.5F, pero no a 7PN respecto a los WT. (B) La proporción de células Ly51^{lo}UEA1^{hi} presenta el mismo patrón que la subpoblación Ly51^{med}UEA1^{hi}, aumentando entre 15.5F y 7PN en todos los timos analizados, observándose de nuevo un porcentaje significativamente menor de estas células en los timos mutantes a 17.5F y sólo en los timos EphB2^{-/-} a 7PN respecto a los WT. (C) La proporción de células Ly51⁻UEA1^{hi} aumenta de manera acusada entre 17.5F y 7PN en los timos WT, pero no así en los timos mutantes, que presentan porcentajes significativamente más bajos a 7PN respecto a los WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

En conjunto, estos resultados indicarían un retraso en la regulación positiva del marcador Ly51, que correlaciona con retrasos temporales en la maduración de las células epiteliales corticales desde estadios tempranos del desarrollo (12.5F) hasta llegar a 17.5F. A partir de este estadio y hasta 7PN existiría un retraso similar en la maduración de las células epiteliales medulares (UEA1) en todos los mutantes, que se traduce a 7PN en valores altos de las poblaciones corticales (Ly51^{med}UEA1^{lo/med} y Ly51^{hi}UEA1^{lo/med}) y bajos de la población medular Ly51⁻UEA1^{hi}.

Cuando se comparan entre sí los porcentajes de la población más inmadura ($\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^-$), entre los mutantes estudiados, observábamos que los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ acumulaban mayor porcentaje de estas células a 14.5F y 15.5F respecto a los timos EphB2LacZ (**Fig. 48A**) y sólo a 14.5F respecto a los $\text{EphB3}^{-/-}$ (**Fig. 48B**), confirmando el mayor retraso en la maduración de estas células en los ratones deficientes en EphB2 , siendo éstos más parecidos a los deficientes en EphB3 , respecto de los que expresaban EphB2LacZ .

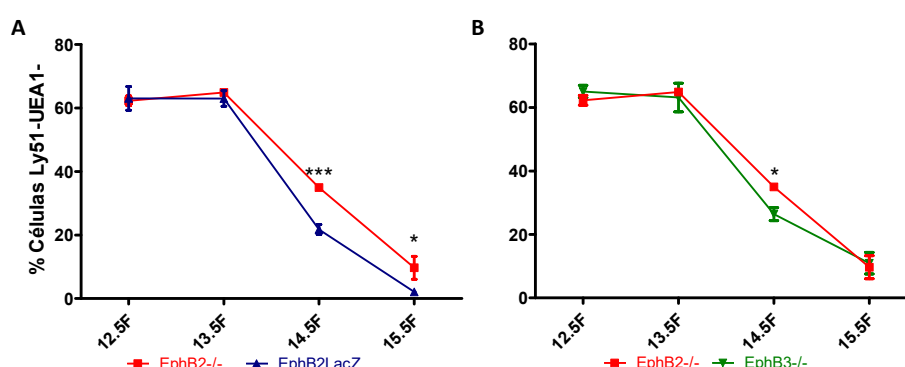


Figura 48. Análisis comparado de la evolución de la subpoblación $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^-$ a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-15.5F) entre timos $\text{EphB2}^{-/-}$ vs EphB2LacZ y $\text{EphB2}^{-/-}$ vs $\text{EphB3}^{-/-}$. **(A)** Los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ presentan un porcentaje significativamente mayor de células $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^-$ a 14.5F y 15.5F respecto a los timos EphB2LacZ . **(B)** No se encontraron diferencias significativas en esta subpoblación al comparar los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ vs $\text{EphB3}^{-/-}$ excepto a 14.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.005$, según el análisis estadístico de la t de Student.

Analizando el resto de subpoblaciones epiteliales pudimos observar que la proporción de células $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^-$ era significativamente menor a 14.5F y mayor a 15.5F y 17.5F en $\text{EphB2}^{-/-}$ que en EphB2LacZ (**Fig. 49A**), lo que correlacionaba con una mayor proporción de células $\text{Ly51}^{\text{med}}\text{UEA1}^-$ en estos últimos a 15.5F (**Fig. 49C**). En cambio, la proporción de células $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^-$ en los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ era significativamente menor a 15.5F y mayor a 17.5F respecto de los valores $\text{EphB3}^{-/-}$ (**Fig. 49B**), lo que correlacionaba con una mayor proporción de células $\text{Ly51}^{\text{med}}\text{UEA1}^-$ en $\text{EphB2}^{-/-}$ a 15.5F (**Fig. 49D**). Estos resultados indican que el fenotipo mostrado por los ratones $\text{EphB2}^{-/-}$ era más severo que el de los EphB2LacZ , cuyo comportamiento era más parecido al de los ratones WT. Las diferencias entre $\text{EphB2}^{-/-}$ y $\text{EphB3}^{-/-}$ son escasas y, aunque apuntan a un fenotipo más severo en algunos estadios para los timos $\text{EphB3}^{-/-}$,

podrían también deberse más a la variabilidad entre especímenes que a verdaderas diferencias fenotípicas.

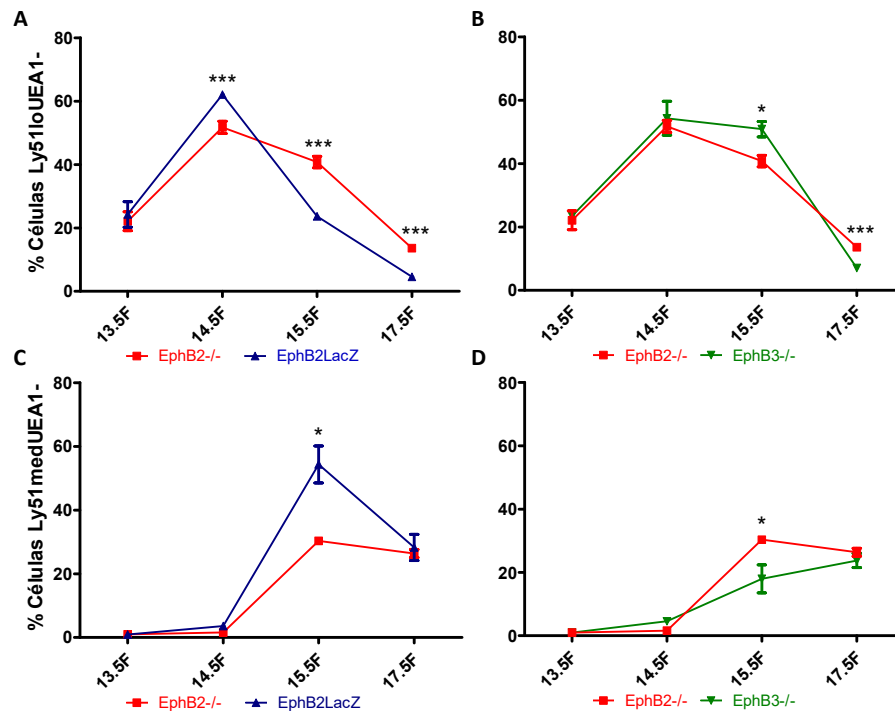


Figura 49. Análisis comparado de la evolución de las subpoblaciones Ly51^{lo}UEA1⁻ y Ly51^{med}UEA1⁻ entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} desde 13.5F a 17.5F. Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células Ly51^{lo}UEA1⁻ a 14.5F y mayor a 15.5F y 17.5F respecto a los timos EphB2LacZ (A), mientras que al comparar con los timos EphB3^{-/-}, el porcentaje en los EphB2^{-/-} era significativamente menor a 15.5F y mayor a 17.5F. (B) Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células Ly51^{med}UEA1⁻ a 15.5F respecto a los timos EphB2LacZ (C), y mayor respecto a los EphB3^{-/-} (D). Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

El análisis de la subpoblación Ly51^{med}UEA1^{lo/med} entre EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (Fig. 50A) y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (Fig. 50B), apunta de nuevo, un retraso en la maduración en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} en comparación a los EphB2LacZ que se parecen más a los WT. Así, en los timos EphB2LacZ aumentaba la proporción de esta población (Fig. 50A) con respecto a los timos EphB2^{-/-} a 17.5F y disminuía a 7PN, lo que indicaría una mayor diferenciación en los EphB2LacZ de esta subpoblación a partir de la Ly51^{lo}UEA1⁻ (Fig. 49A) y, posteriormente, de la Ly51^{med}UEA1⁻ (Fig. 49C) o, como hemos visto anteriormente, un mayor retraso en la maduración de esta población en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}. Comparando las poblaciones de EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, sólo se observó un incremento de la población Ly51^{med}UEA1^{lo/med} a 7PN (Fig. 50B) lo que

reflejaba la no maduración de la población en EphB2^{-/-}. Por otro lado, no se observaron diferencias en la subpoblación Ly51^{hi}UEA1^{lo/med} (**Fig. 50C, D**), aunque como hemos visto a 17.5F los timos EphB2LacZ se comportaban como los WT, y los EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} tenían valores significativamente más bajos (**Fig. 46B**), mientras que a 7PN todos los mutantes estaban por encima de los WT, pero con el menor aumento en el caso de EphB2LacZ.

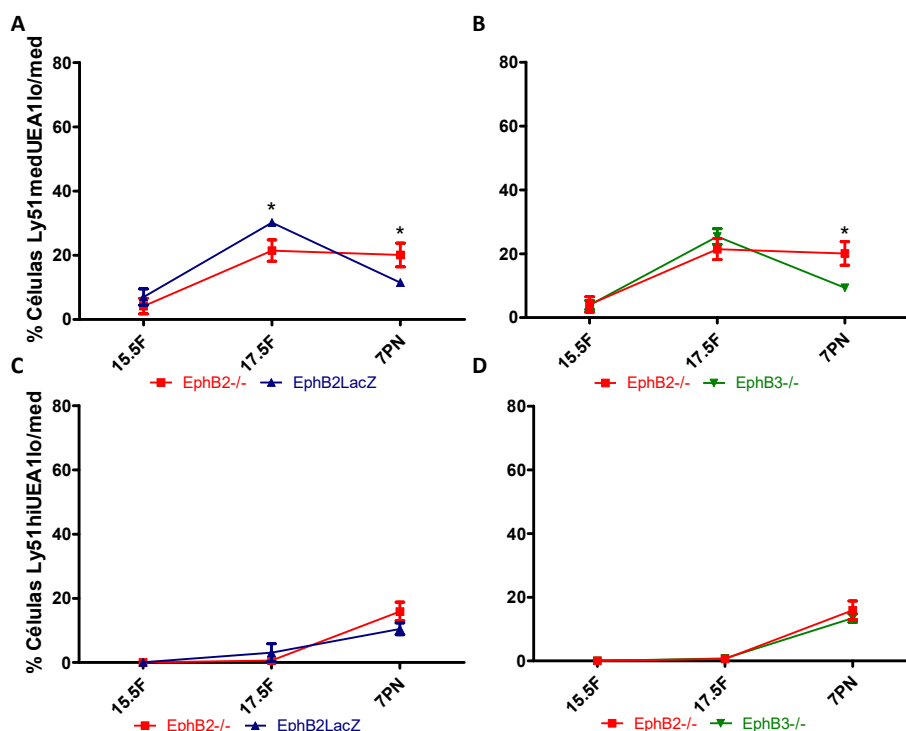


Figura 50. Análisis comparado de la evolución de las subpoblaciones Ly51^{med}UEA1^{lo/med} y Ly51^{hi}UEA1^{lo/med} entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} desde 15.5F a 7PN. Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células Ly51^{med}UEA1^{lo/med} a 17.5F y mayor a 7PN respecto a los timos EphB2LacZ (**A**) y EphB3^{-/-} (**B**). No se encontraron diferencias en la subpoblación Ly51^{hi}UEA1^{lo/med} entre los timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (**C**), ni entre los timos EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (**D**). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Por último, al comparar las subpoblaciones medulares maduras entre los diferentes mutantes, observábamos como las proporciones de las poblaciones UEA1^{hi} (Ly51^{med} y Ly51^{lo}, **Fig. 51**) de ratones EphB2LacZ eran, en general, significativamente mayores que la de los ratones EphB2^{-/-} (**Fig. 51A, C**), lo que confirmaba el retraso en la maduración de estos últimos timos y la semejanza de los EphB2LacZ con WT (**Fig. 47A, B**); aunque no había diferencias en la Ly51⁻UEA1^{hi} (**Fig. 51E**). La comparación de las poblaciones UEA1^{hi} entre timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} mostraba que la ausencia de ambas moléculas

tenía efectos diferentes sobre las poblaciones TEC medulares con una capacidad ligeramente mayor de maduración de las células EphB3^{-/-} o mayor retraso en los timos EphB2^{-/-}. En las tres subpoblaciones UEA1^{hi} (**Fig. 51**) definidas por la expresión de Ly51, las proporciones de células en los timos EphB2^{-/-} son significativamente más bajas (mayor retraso en la maduración) que en los timos EphB3^{-/-}: en Ly51^{med} a 17.5F (**Fig. 51B**), en Ly51^{lo} a 17.5F y 7PN (**Fig. 51D**), y en Ly51⁻ a 7PN (**Fig. 51F**).

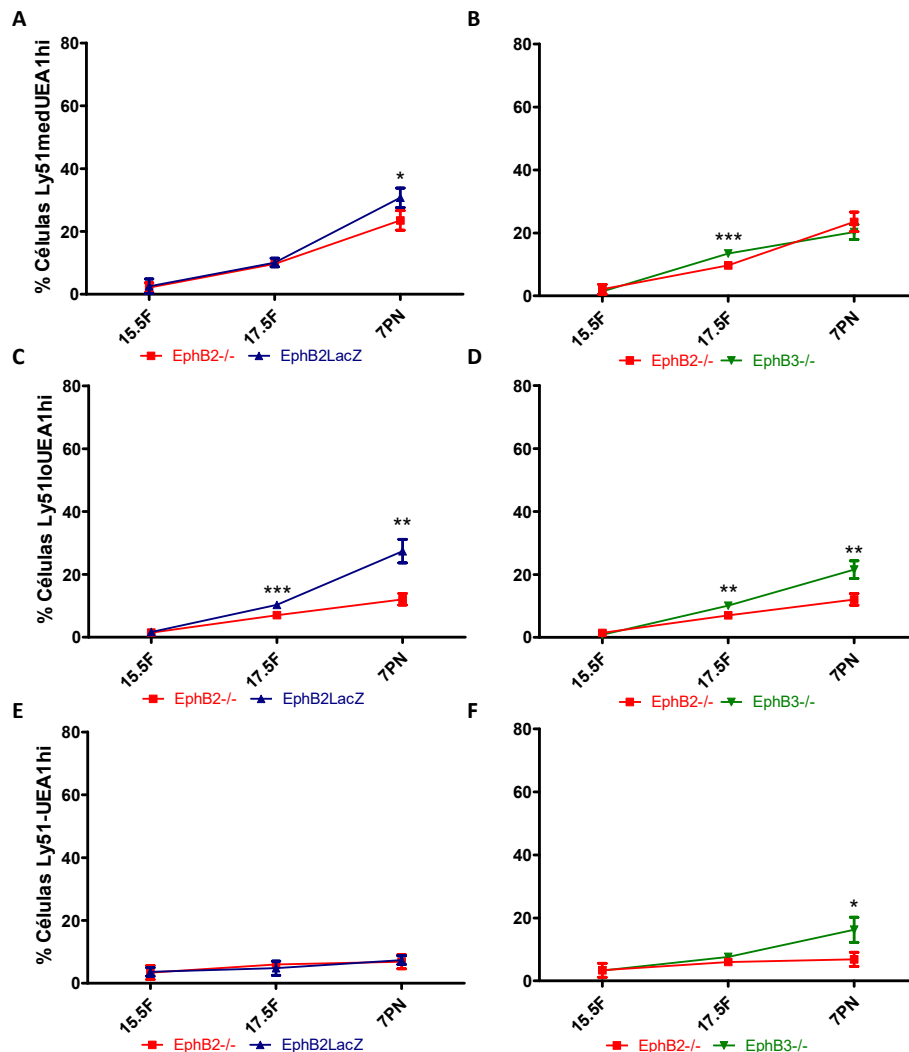


Figura 51. Análisis comparado de la evolución de las subpoblaciones Ly51^{med}UEA1^{hi}, Ly51^{lo}UEA1^{hi} y Ly51⁻UEA1^{hi} entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} desde 15.5F a 7PN. Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células Ly51^{med}UEA1^{hi} a 7PN respecto a los timos EphB2LacZ (**A**) y a 17.5F respecto a los EphB3^{-/-} (**B**). Los timos EphB2^{-/-} tienen un porcentaje significativamente menor de células Ly51^{lo}UEA1^{hi} desde 17.5F respecto a los timos EphB2LacZ (**C**), y EphB3^{-/-} (**D**). No existen diferencias en la subpoblación Ly51⁻UEA1^{hi} entre los timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (**E**), pero sí respecto a los EphB3^{-/-} a 7PN, estando significativamente reducida en los EphB2^{-/-} (**F**). Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

En general, podemos concluir que los timos EphB3^{-/-} parecen presentar un fenotipo ligeramente más severo respecto de la maduración de las células corticales definidas por el marcador Ly51, mientras que en timos EphB2^{-/-} se afectaría más la expansión o maduración del epitelio medular (UEA1⁺). El fenotipo de los timos EphB2LacZ es más similar al WT, indicando que la recuperación de la señal *reverse* en el timo, favorecería la maduración del epitelio tanto cortical como medular. Matizando algo más podríamos decir que, respecto a las poblaciones así definidas, la falta de EphB3 afecta menos que la de EphB2 al desarrollo del epitelio medular, mientras que las dos EphB, con ligero predominio de EphB3, afectan el epitelio cortical.

1.4. Análisis de las poblaciones Ly51 y UEA1 en base a la expresión de MTS20

Los resultados descritos anteriormente mostraban alteraciones en la maduración de las principales poblaciones epiteliales corticales y medulares, definidas por la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 respectivamente, de los timos deficientes en EphB, alteraciones que acontecían fundamentalmente en dos momentos diferentes del desarrollo. Así, la aparición y regulación positiva de la expresión del marcador cortical Ly51 se producía principalmente entre 12.5F y 17.5F, mientras que la expansión de las células UEA1 y, en consecuencia la maduración medular sucedía a partir de 15.5F hasta el periodo postnatal.

Por otro lado, como hemos explicado previamente, los timos deficientes en EphB mostraban también desde 13.5F un incremento de células inmaduras MTS20⁺ y un descenso de células maduras MTS20⁻. Con el fin de relacionar si las alteraciones encontradas en las poblaciones Ly51⁺ y UEA1⁺ (apartado 1.3), dentro de la población epitelial total (EpCAM⁺CD45⁻) eran debidas a alteraciones en la maduración de las células MTS20⁺ o de las MTS20⁻, realizamos un estudio combinando la expresión de los marcadores MTS20, Ly51 y UEA1, dentro de la población epitelial (EpCAM⁺), previo aislamiento mediante selección magnética del estroma tímico CD45⁻ (ver Material y Métodos).

Como muestra la **Figura 52**, en el timo en desarrollo de los animales WT la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 ocurría tanto en células MTS20⁺ como MTS20⁻, pudiéndose definir 4 subpoblaciones diferentes en cada una de ellas (Ly51⁻UEA1⁻,

Ly51⁺UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁺, Ly51⁻UEA1⁺) pero con valores muy diferentes. Calculamos entonces el porcentaje que representaba cada una de estas subpoblaciones dentro de la población MTS20⁺ o MTS20⁻. Para ello, multiplicamos el porcentaje obtenido de cada una de las subpoblaciones Ly51/UEA1 dentro de las células MTS20⁺ o MTS20⁻ por el porcentaje que representaba cada una de estas dos subpoblaciones en el total del epitelio tímico EpCAM⁺CD45⁻.

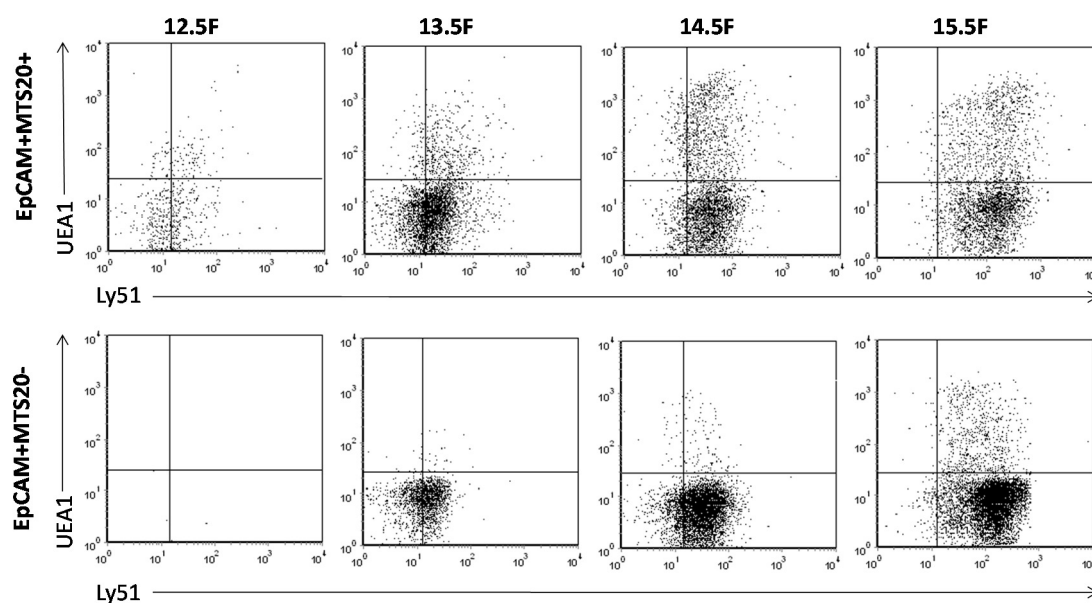


Figura 52. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas definidas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 dentro de la población epitelial inmadura MTS20⁺ o más madura MTS20⁻ durante el desarrollo embrionario temprano (12.5F-15.5F) en los timos WT. Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales en base a la expresión de Ly51 y UEA1 dentro de la población EpCAM⁺MTS20⁺ o EpCAM⁺MTS20⁻ en los timos WT. Tal y como muestran los *dot plots* a lo largo del desarrollo se definen las siguientes poblaciones: Ly51⁻UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁺, Ly51⁻UEA1⁺. Nótese como la presencia de células Ly51/UEA1 están tanto en la población MTS20⁺ como en la MTS20⁻, sin embargo, su aparición sucede a 12.5F en la población más inmadura. Los *dot plots* son representativos de los experimentos realizados para cada estadio.

A 12.5F la población celular mayoritaria correspondía a células MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁻ (65.75%), pero también existía una población MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ (19.32%) y unas pocas células MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ y MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁺ (**Fig. 53A**). En este estadio, las células que no expresaban MTS20 prácticamente no existían, con la excepción de una baja proporción de células MTS20⁻Ly51⁻UEA1⁻ (**Fig. 53B**). Entre 12.5F y 13.5F, la población MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁻ va decreciendo coincidiendo con el incremento de la población MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ y de la MTS20⁻Ly51⁻UEA1⁻.

Entre 13.5F y 14.5F, la población MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁻ sigue disminuyendo y aumentando ligeramente la MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ (**Fig. 53A**), sin embargo, la población

que experimenta una mayor expansión entre estos estadios es la $MTS20^-Ly51^+UEA1^-$ (**Fig. 53B**). No sabemos si esta última población se origina a partir de células $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ que regulan negativamente la expresión de MTS20 y positivamente la de Ly51 o por el contrario proceden de las células $MTS20^+Ly51^+UEA1^-$ existentes a 12.5F que dejan de expresar MTS20. Una doble contribución de ambas subpoblaciones tampoco es descartable. En cualquier caso, el paso debe ser muy rápido porque la población $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ desciende rápidamente.

Entre 14.5F y 15.5F, la población $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ desaparece y disminuyen también las células $MTS20^+Ly51^+UEA1^-$ (**Fig. 53A**). Este hecho correlaciona con un incremento de la población $MTS20^-Ly51^+UEA1^-$ (**Fig. 53B**).

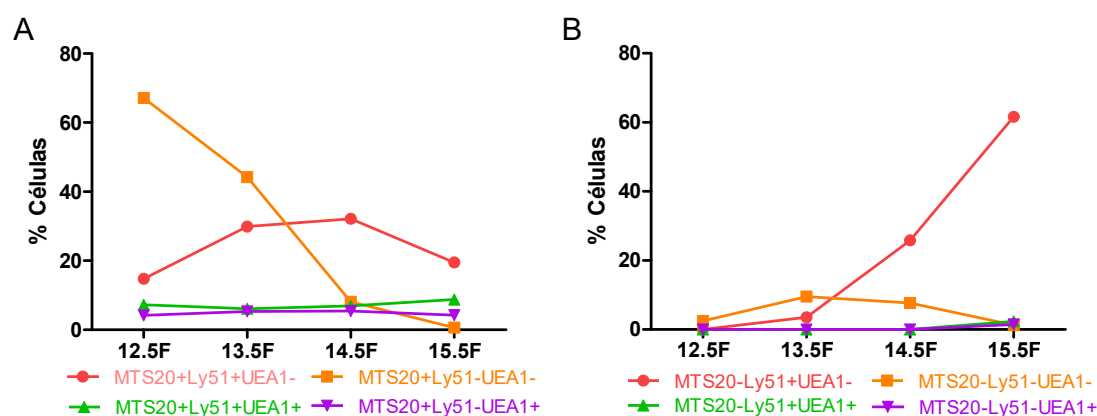


Figura 53. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 dentro de la población inmadura $MTS20^+$ o madura $MTS20^-$ durante el desarrollo embrionario temprano (12.5F-15.5F) en los timos WT. Se analizó la aparición y evolución de distintas subpoblaciones epiteliales Ly51/UEA1 dentro de la población $EpCAM^+MTS20^+$ (A) o $EpCAM^+MTS20^-$ (B) en los timos WT. Las gráficas muestran como la población mayoritaria a 12.5F $MTS20^+Ly51^+UEA1^-$ (A) decae hasta 15.5F. A 12.5F comienza el aumento de la población $MTS20^+Ly51^+UEA1^-$ (A) pero sólo hasta 14.5F, mientras que la $MTS20^-Ly51^+UEA1^-$ (B) aumenta bruscamente desde 13.5F hasta 15.5F. Dentro de la población $MTS20^-$, la proporción de células $Ly51^+UEA1^-$ es muy baja, al igual que el resto de poblaciones, $Ly51^+UEA1^+$ y $Ly51^-UEA1^+$, que además son más evidentes dentro de la población $MTS20^+$.

Por otro lado, a partir de 12.5F las poblaciones $MTS20^+Ly51^+UEA1^+$ y $MTS20^+Ly51^-UEA1^+$ mantienen su porcentaje prácticamente invariable hasta 15.5F, mientras que las células $MTS20^-Ly51^+UEA1^+$ y $MTS20^-Ly51^-UEA1^+$ únicamente aparecen a 15.5F, pero en muy baja proporción (**Fig. 53A, B**). Presumiblemente estas poblaciones contribuyen poco a la maduración de los progenitores de las células epiteliales corticales.

Al analizar la aparición y evolución de estas subpoblaciones descritas en los timos WT en los timos mutantes, observamos que la población $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ incrementaba en todos ellos desde 13.5F, excepto a 15.5F en los timos EphB2LacZ. A 12.5F los valores son más bajos en los mutantes aunque no significativamente (**Fig. 54**).

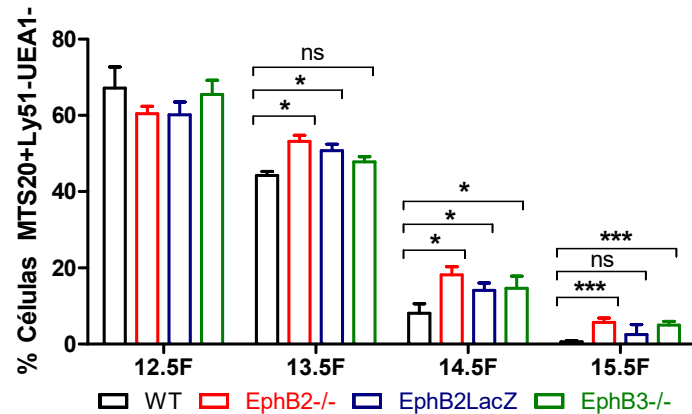


Figura 54. Evolución de la subpoblación $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 15.5F. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. En los timos WT esta población disminuye gradualmente entre 12.5F y 15.5F, donde prácticamente es inexistente. Sin embargo, aunque en los timos mutantes la evolución es similar, a 12.5F todos los mutantes presentan valores ligeramente menores que los WT, aunque de manera no significativa, que incrementan significativamente a 13.5F en los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, a 14.5F en todos los mutantes y a 15.5F sólo en EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} respecto a los WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 experimentos para cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Esta acumulación correlacionaba con un porcentaje significativamente menor de células $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ en todos ellos a 13.5F (**Fig. 55**). En los estadios siguientes, los valores mutantes aumentan por encima de los WT, aunque sólo lo hacen significativamente a 15.5F. A 14.5F el significativo aumento de la proporción de células $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ hace que a pesar del aumento observado en la proporción de células $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$, ésta no alcance significación estadística, demostrando, de nuevo, un retraso en la maduración epitelial en ausencia de EphB. Por su parte, el aumento de la población $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ a 15.5F en todos los timos mutantes (**Fig. 55**) resultaba en una reducción significativa en la proporción de células $MTS20^-Ly51^-UEA1^-$ en este estadio pero no en los anteriores (**Fig. 56**). Este resultado indicaría que las células $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ serían una población intermedia entre las células $MTS20^+Ly51^-UEA1^-$ y las $MTS20^-Ly51^-UEA1^-$; de tal modo que la diferenciación de las células comprometidas con el linaje cortical partiría de una población $MTS20^+Ly51^-$

UEA1⁻ que regula positivamente la expresión de Ly51 (MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻) para posteriormente regular negativamente la de MTS20 (MTS20⁻Ly51⁺UEA1⁻).

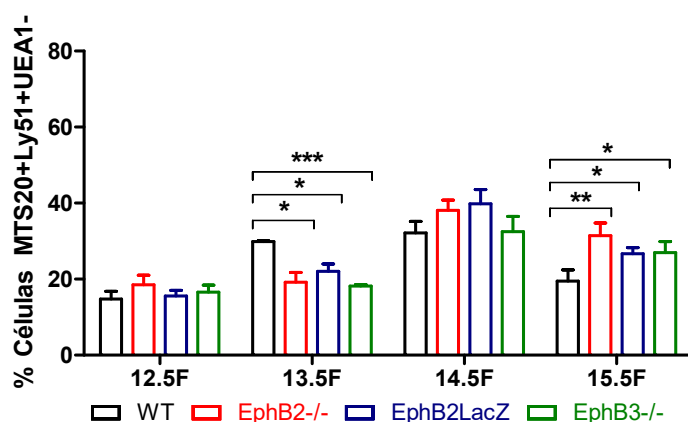


Figura 55. Evolución de la subpoblación MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 15.5F. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. En los timos WT y en los mutantes esta población aumenta ligeramente entre 12.5F y 14.5F, para después disminuir. Sin embargo, los timos mutantes presentan un porcentaje significativamente menor a 13.5F respecto a los WT, y mayor a 14.5F y 15.5F, pero sólo significativamente en este último estadio. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 experimentos para cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

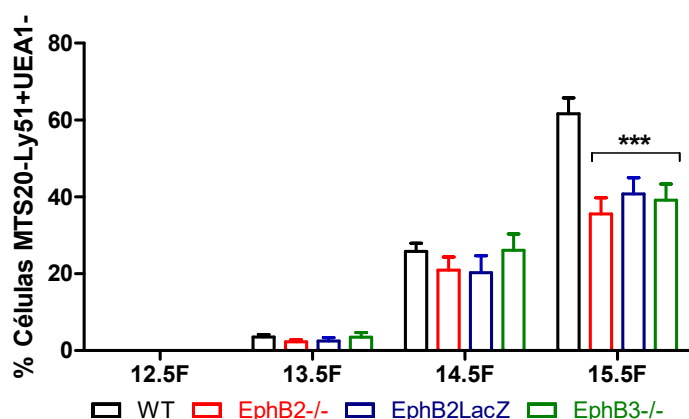


Figura 56. Evolución de la subpoblación MTS20⁻Ly51⁺UEA1⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 15.5F. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación MTS20⁻Ly51⁺UEA1⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Esta población, tanto en los timos WT como en los mutantes, aumenta gradualmente entre 12.5F y 15.5F. Sin embargo, en estos últimos se observa una proporción significativamente menor de células a 15.5F, la cual ya comenzaba a ser evidente a 14.5F en el caso de los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, aunque de forma no significativa. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 experimentos para cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Finalmente, no observábamos diferencias en las poblaciones Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁻UEA1⁺ dentro de las subpoblaciones MTS20⁺ (Fig. 57A, B) y MTS20⁻ (Fig. 58A, B), con la excepción de un incremento significativo de células MTS20⁻Ly51⁺UEA1⁺ y MTS20⁻Ly51⁻

UEA1⁺ a 15.5F en los timos EphB2LacZ. La ausencia de diferencias entre estas poblaciones que expresan el marcador medular UEA1 se debía posiblemente a que en estos estadios no se ha expandido aun la población medular tal y como veíamos que sucedía a 17.5F (apartado 1.3). Estos resultados no nos permitían tampoco establecer las relaciones entre la población MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ y MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁺ puesto que no se observaban diferencias entre mutantes y WT, como veíamos en el caso de los presuntos progenitores corticales.

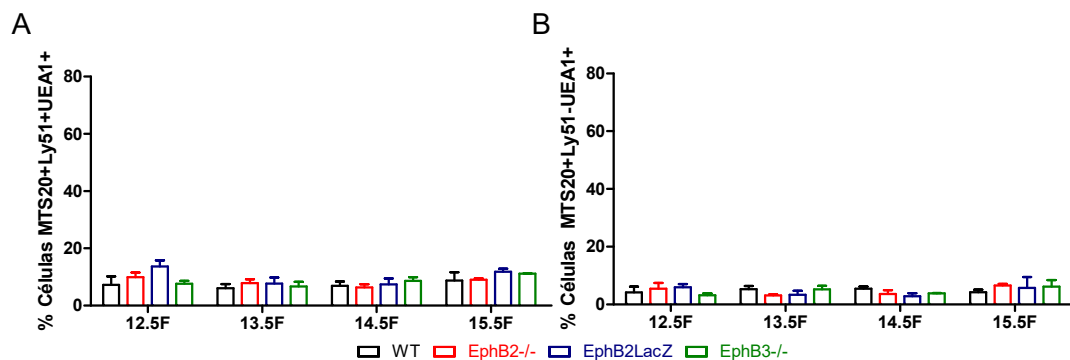


Figura 57. Evolución de las subpoblaciones MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ y MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁺ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 15.5F. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ (A) y MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁺ (B) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como estas poblaciones se mantienen prácticamente constantes durante el desarrollo fetal tanto en timos WT como mutantes, sin que existan diferencias significativas al compararse entre sí. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 experimentos para cada estadio.

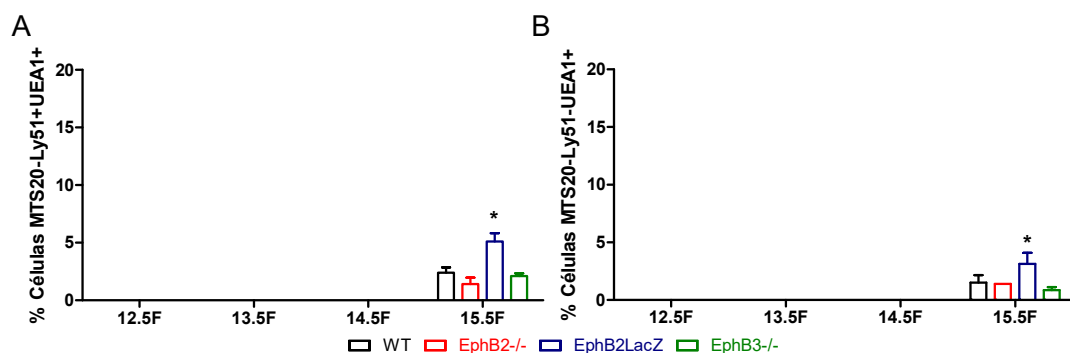


Figura 58. Evolución de las subpoblaciones MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ y MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁺ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 15.5F. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ (A) y MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁺ (B) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como estas poblaciones sólo aparecen a 15.5F, a diferencia de las analizadas dentro de la población MTS20⁺ (Fig. 57), tanto en timos WT como mutantes, y sólo los timos EphB2LacZ presentan porcentajes significativamente mayores de ambas poblaciones respecto a los timos WT. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 experimentos para cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: **p* < 0.05 según el análisis estadístico de la *t* de Student.

1.5. Evolución del epitelio cortical

1.5.1. Poblaciones definidas por la expresión de CD205

Con el fin de profundizar en el estudio de las células epiteliales corticales analizamos la expresión del marcador cortical CD205, también conocido como DEC205 (*Jiang y cols., 1995*). CD205 es una lectina tipo C de la familia de receptores de manosa que aparece ya en el timo fetal (*Shakib y cols., 2009*) y actúa en endocitosis incorporando moléculas a las TEC corticales que presentarán después en el contexto de moléculas de MHC I y II (*Bonifaz y cols., 2002*). Su ausencia, sin embargo, no afecta a la maduración funcional de los timocitos (*Jenkinson y cols., 2012*) y su función en el órgano es realmente desconocida.

La expresión de CD205 fue analizada, dentro de la población epitelial EpCAM⁺CD45⁻, en combinación con el marcador Ly51 mediante citometría de flujo en el timo de ratones WT y deficientes en EphB únicamente a 14.5F y 15.5F. Trabajos anteriores habían proporcionado resultados contradictorios: mientras algunos autores indicaban que la expresión de CD205 comienza a 12.5F y a 13.5F (*Shakib y cols., 2009; Baik y cols., 2013; Ribeiro y cols., 2013*), otros, Saldaña y colaboradores (*Saldana y cols., 2016*), al igual que observábamos nosotros, describen una baja expresión en 14.5F y 15.5F a pesar de que en todos estos trabajos se utilizaban los mismos anticuerpos.

Inicialmente, analizamos la expresión total de CD205 dentro de la población epitelial EpCAM⁺CD45⁻ a 14.5F y 15.5F en el timo de los animales WT (**Fig. 59**) y observábamos, como hemos comentado previamente, un ligero incremento de células CD205⁺ entre ambos. Al analizar la expresión de esta molécula en los timos mutantes observábamos que en todos ellos había también un incremento en la expresión de la molécula entre ambos estadios, pero la proporción de células CD205⁺ totales disminuía significativamente en todos con respecto a los valores WT en ambos estadios, muy en especial en el caso de los timos EphB3^{-/-}. Por el contrario, y especialmente a 15.5F, los timos deficientes en EphB2 eran los menos afectados.

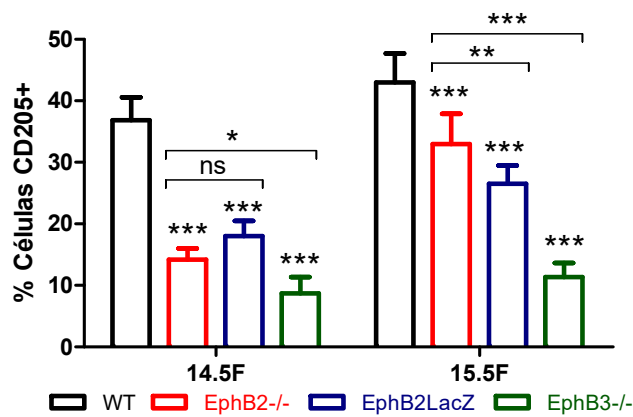


Figura 59. Análisis del porcentaje total de células CD205⁺ en los timos WT y deficientes en EphB a 14.5F y 15.5F. La gráfica muestra como la proporción de células CD205⁺ dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻, aumenta ligeramente en todos los timos entre 14.5F y 15.5F. Sin embargo, en los timos mutantes la proporción de células CD205⁺ es significativamente menor que en los WT. Esta reducción es más acusada en el caso de los EphB3^{-/-} que en el resto de mutantes en ambos estadios analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

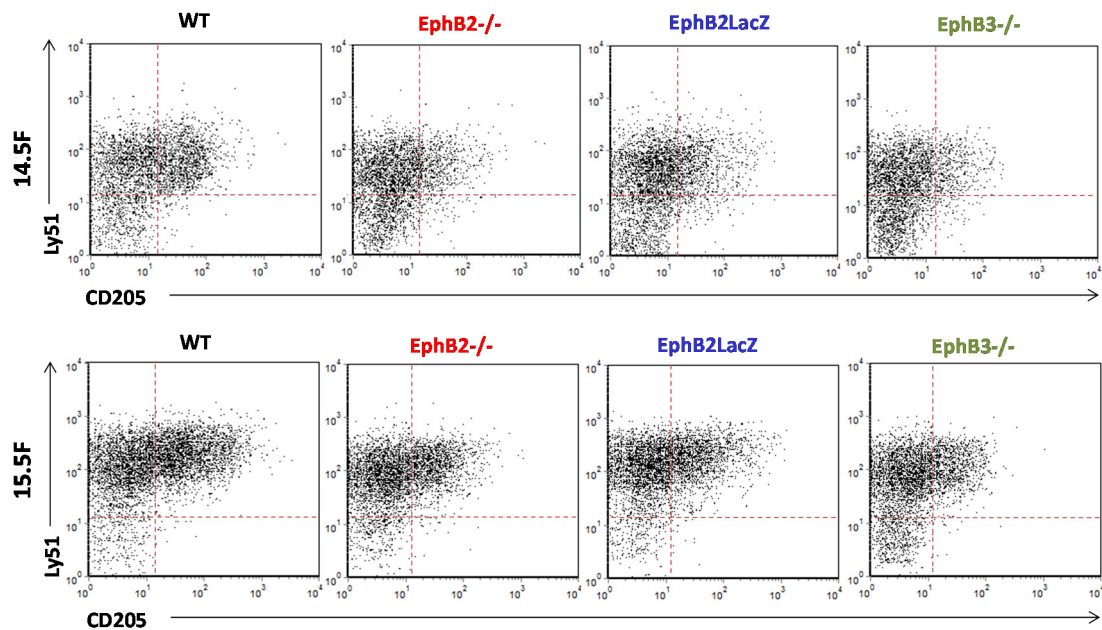


Figura 60. Análisis de la población epitelial cortical en base a la expresión de los marcadores Ly51 y CD205 a 14.5F y 15.5F en timos WT y deficientes en EphB. Se analizó la aparición y evolución de diferentes subpoblaciones epiteliales corticales identificadas en base a la expresión de Ly51 y CD205 dentro de la población epitelial total (EpCAM⁺CD45⁻) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} a 14.5F y 15.5F. Tal y como muestran los *dot plots*, en base a la expresión de estas moléculas, se definen tres subpoblaciones: Ly51⁻CD205⁺, Ly51⁺CD205⁻ y Ly51⁺CD205⁺. Nótese que todas las células CD205⁺ son Ly51⁺, tanto en WT como en mutantes, y la proporción de células Ly51⁺CD205⁺ incrementa ligeramente entre 14.5F y 15.5F. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados en cada estadio.

En base a estos resultados, combinamos la expresión de CD205 con la de Ly51 para determinar si la reducción en la expresión de CD205 co-relacionaba con la de Ly51. Tal y como se muestra en los *dot plots* de la **Figura 60** a 14.5F en el timo WT podían identificarse tres poblaciones en base a la expresión de Ly51 y CD205: una población que no expresa ninguno de los marcadores (Ly51⁻CD205⁻), otra que expresa Ly51 pero no CD205 (Ly51⁺CD205⁻) y, finalmente, una población doble positiva (Ly51⁺CD205⁺). Centramos nuestro estudio en estas dos últimas poblaciones que eran las que realmente correspondían a TEC corticales y además estaban relacionadas, puesto que posiblemente, la Ly51⁺CD205⁺ se originaría por regulación positiva de la expresión de CD205. Ambas poblaciones Ly51⁺CD205⁻ y Ly51⁺CD205⁺ incrementaban ligeramente entre ambos estadios aunque más claramente en el caso de la población doble positiva (**Fig. 60, 61**).

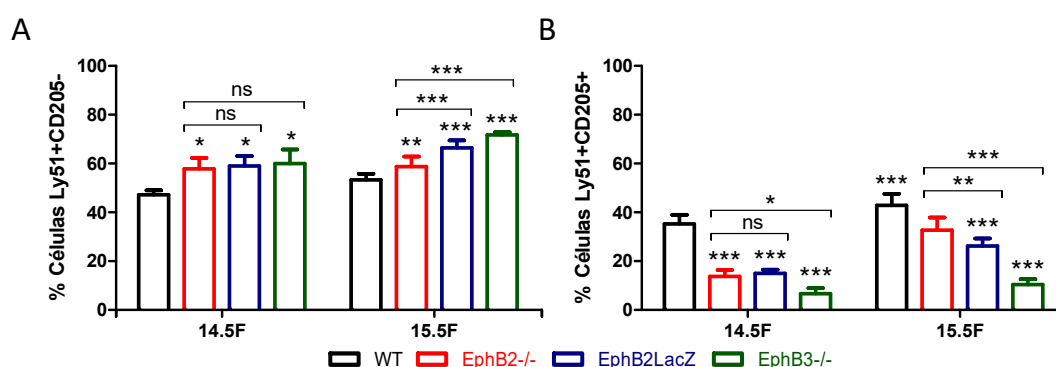


Figura 61. Análisis de las poblaciones epiteliales corticales Ly51⁺CD205⁻ y Ly51⁺CD205⁺ en timos WT y deficientes en EphB a 14.5F y 15.5F. (A) La gráfica muestra como la proporción de células Ly51⁺CD205⁻ se mantiene prácticamente constante tanto en timos WT como mutantes entre 14.5F y 15.5F. Sin embargo, a 14.5F y 15.5F esta población aumenta significativamente en todos ellos respecto a los valores WT. A 15.5F el incremento es particularmente notable en los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (B) La gráfica muestra como la proporción de células Ly51⁺CD205⁺ aumenta ligeramente en todos los timos entre 14.5F y 15.5F, sin embargo, su proporción en los timos mutantes se reduce significativamente respecto a los valores WT. En ambos estadios, los timos EphB3^{-/-} presentan la menor proporción. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Cuando analizamos en los timos mutantes las subpoblaciones previamente definidas en ambos estadios, todas estaban presentes (**Fig. 60**), y tenían una cinética de desarrollo similar a la descrita en los timos WT, aunque de nuevo existían diferencias en su maduración. La población de células corticales Ly51⁺CD205⁻ aumentaba significativamente en los tres timos mutantes, tanto a 14.5F como a 15.5F (**Fig. 61A**), confirmando la acumulación de células Ly51⁺ totales antes descrita (**Ver Fig. 45A**) y su incapacidad para diferenciar a la población Ly51⁺CD205⁺, que presumiblemente

derivaba de la primera, y mostraba proporciones significativamente más bajas que en los timos WT, particularmente en el caso de los ratones EphB3-/- (**Fig. 61B**).

1.5.2. Poblaciones definidas por la expresión de Ly51 y CD40

Puesto que Ly51 y CD205 son marcadores fenotípicos cuyo significado funcional es básicamente desconocido, decidimos incluir en nuestro estudio otros marcadores cuya función en el timo fuera conocida; así combinamos la expresión de Ly51 con la de la molécula coestimuladora CD40, que es un marcador funcional presente en todas las TECs maduras tanto corticales como medulares (*Shakib y cols., 2009; Ribeiro y cols., 2013*).

El estudio se inició en timos de 13.5F, que es cuando comienza a expresarse CD40 (*Shakib y cols., 2009; Baik y cols., 2013*). Tal y como muestran los *dot plots* de la **Figura 62**, la expresión de CD40 al igual que sucedía con la de Ly51, estaba regulada durante el desarrollo, pudiendo definirse diferentes subpoblaciones (negativas (-) (1, 4, 7), *low* (lo) (2, 5, 8) y *medium/high* (med/hi) (3, 6, 9, 10) en base a sus niveles de expresión y a los de Ly51, y cuya evolución se muestra en la **Figura 63A-C**. La evolución de estas subpoblaciones muestra un patrón similar a la descrita por Ribeiro y colaboradores (*Ribeiro y cols., 2013*), aunque estos autores combinaban la expresión de CD40 con la de CD205 y no con la de Ly51.

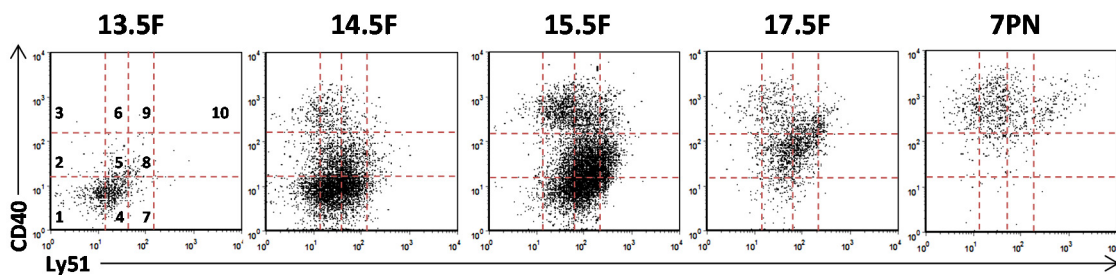


Figura 62. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores CD40 y Ly51 durante el desarrollo embrionario (13.5F-17.5F) y 7PN en timos WT. Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales dentro de la población EpCAM⁺CD45⁻ en los timos WT según el nivel de expresión del marcador funcional CD40 y el cortical Ly51. Tal y como se observa en los *dot plots* a lo largo del desarrollo se definen las siguientes subpoblaciones: 1=CD40⁻Ly51⁻, 2=CD40^{lo}Ly51⁻, 3=CD40^{med/hi}Ly51⁻, 4=CD40⁻Ly51^{lo}, 5=CD40^{lo}Ly51^{lo}, 6=CD40^{med/hi}Ly51^{lo}, 7=CD40⁻Ly51^{med}, 8=CD40^{lo}Ly51^{med}, 9=CD40^{med/hi}Ly51^{med} y 10=CD40^{med/hi}Ly51^{hi}. Nótese como la proporción relativa de cada una de las subpoblaciones varía dependiendo del estadio analizado y como la regulación de la expresión de CD40 comienza después que la de Ly51. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados en cada estadio.

En el timo WT a 13.5F existían dos poblaciones epiteliales principales en base a la expresión de Ly51 y CD40, una mayoritaria $CD40^{\text{lo}}Ly51^{-}$ (**Fig. 63A**) y otra $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{lo}}$ (**Fig. 63B**) y, en menor medida, una población $Ly51^{\text{lo}}$ que expresaba $CD40^{\text{lo}}$. En este estadio también existía una pequeña población $CD40^{\text{lo}}Ly51^{-}$ (**Fig. 63A**). Hasta 15.5F la población más inmadura $CD40^{\text{lo}}Ly51^{-}$ descendía gradualmente (**Fig. 63A**), correlacionando inicialmente con el incremento en la población $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{lo}}$ (**Fig. 63B**) hasta 14.5F, para descender bruscamente a partir de este estadio hasta 7PN. El descenso de esta última subpoblación cursaba con un acusado incremento en dos subpoblaciones $Ly51^{\text{med}}$ a 15.5F que expresaban diferentes niveles de CD40. Por un lado, aparecía una población $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{med}}$ que rápidamente desaparecía a 17.5F (**Fig. 63C**), por lo que podría ser considerada como una población de transición. La otra población mayoritaria $Ly51^{\text{med}}$ que aparecía en este estadio expresaba $CD40^{\text{lo}}$: $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{med}}$ (**Fig. 63C**), que se mantenía en valores similares hasta 17.5F, pero descendía bruscamente a 7PN. Por otro lado, la población $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{lo}}$ que aparecía a 13.5F en baja proporción (**Fig. 63B**), mantenía sus proporciones relativamente constantes hasta 17.5F. Esta población podría originar la población $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{med}}$, aunque ésta también podría derivar de células $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{med}}$ que han regulado positivamente la expresión de CD40. Entre 17.5F y 7PN ocurría un descenso acusado de las dos poblaciones anteriormente mencionadas ($CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{lo}}$ y $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{med}}$) correlacionando con incrementos en las subpoblaciones $Ly51^{\text{lo}}$ y $Ly51^{\text{med}}$ que expresaban niveles $CD40^{\text{med/hi}}$, por lo que a 7PN aumentaban las poblaciones $CD40^{\text{med/hi}}Ly51^{\text{lo}}$ (**Fig. 63B**) y $CD40^{\text{med/hi}}Ly51^{\text{med}}$ (**Fig. 63C**). Es necesario indicar que la subpoblación $CD40^{\text{med/hi}}Ly51^{\text{lo}}$ aparecía a 14.5F, incrementando gradualmente hasta 7PN (**Fig. 63B**) y, aunque desconocemos su origen, posiblemente podría derivar de células $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{lo}}$ que han regulado positivamente la expresión de CD40. Algo similar ocurría con la población $CD40^{\text{med/hi}}Ly51^{\text{med}}$ la cual aparecía a 15.5F y aumentaba gradualmente hasta 7PN (**Fig. 63C**), aunque en menor medida que la población $CD40^{\text{med/hi}}Ly51^{\text{lo}}$ (**Fig. 63B**). También, desconocemos el origen de esta subpoblación, pero podría originarse a partir de células $CD40^{\text{lo}}Ly51^{\text{med}}$ que, de nuevo, regularan positivamente la expresión de CD40. A 7PN, además, hubo un incremento de dos poblaciones ausentes hasta 15.5F. Por un lado, una expansión de la población $Ly51^{\text{hi}}$ que expresaba $CD40^{\text{med/hi}}$ (**Fig. 63C**), y que podrían derivar de células $CD40^{\text{med/hi}}Ly51^{\text{med}}$

que han regulado positivamente la expresión de Ly51. Por otro lado, un incremento de la población $CD40^{med/hi}Ly51^{-}$ (**Fig. 63A**) presumiblemente medular; sin embargo, desconocemos el origen de esta subpoblación, que podrían derivar de células $Ly51^{-}$

que han regulado positivamente la expresión de CD40 o bien de células $CD40^{med/hi}Ly51^{lo}$ que han regulado negativamente la expresión de Ly51. Como conclusión, podemos indicar que a 7PN la mayoría de las células $CD40^{med/hi}$, salvo algunas $Ly51^{-}$ (**Fig. 63A**), son células que expresan distintos niveles de Ly51 (**Fig. 63B, C**) que deben contribuir tanto a la corteza como a la médula.

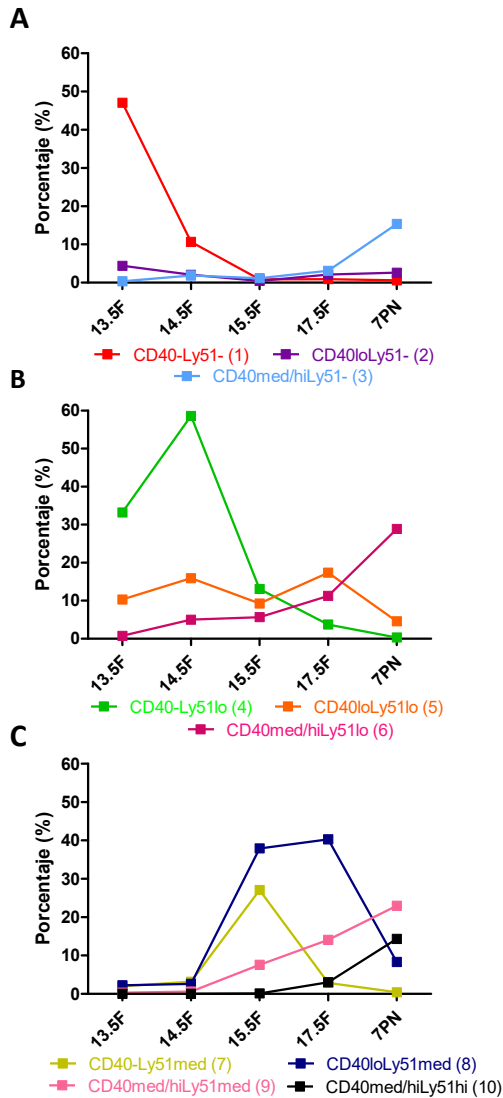


Figura 63. Evolución de las distintas subpoblaciones epiteliales CD40 en relación a la expresión de Ly51 en timos WT fetales y 7PN. Las gráficas muestran la evolución de las distintas subpoblaciones CD40 en base a la expresión diferencial de Ly51: $Ly51^{-}$ (**A**), $Ly51^{lo}$ (**B**) y $Ly51^{med/hi}$ (**C**). Tal y como se observa en las gráficas existe una etapa temprana donde las poblaciones fundamentales son $CD40^{-}$; una etapa intermedia donde aumenta la expresión de CD40, siendo $CD40^{lo}$, alcanzando finalmente la condición $CD40^{med/hi}$.

A la vista de estos resultados se muestra un posible modelo de diferenciación de las TECs definidas por los marcadores CD40 y Ly51 (**Fig. 64**), especulativo, puesto que otras posibilidades son posibles y es difícil establecer la dinámica exacta de las poblaciones intermedias.

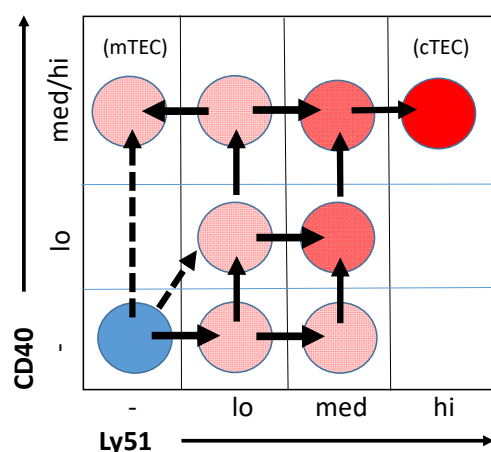


Figura 64. Posible esquema de la aparición de las diferentes subpoblaciones epiteliales definidas por la expresión de CD40 y Ly51 de acuerdo a los datos de su evolución descrita en las Figuras 62 y 63.

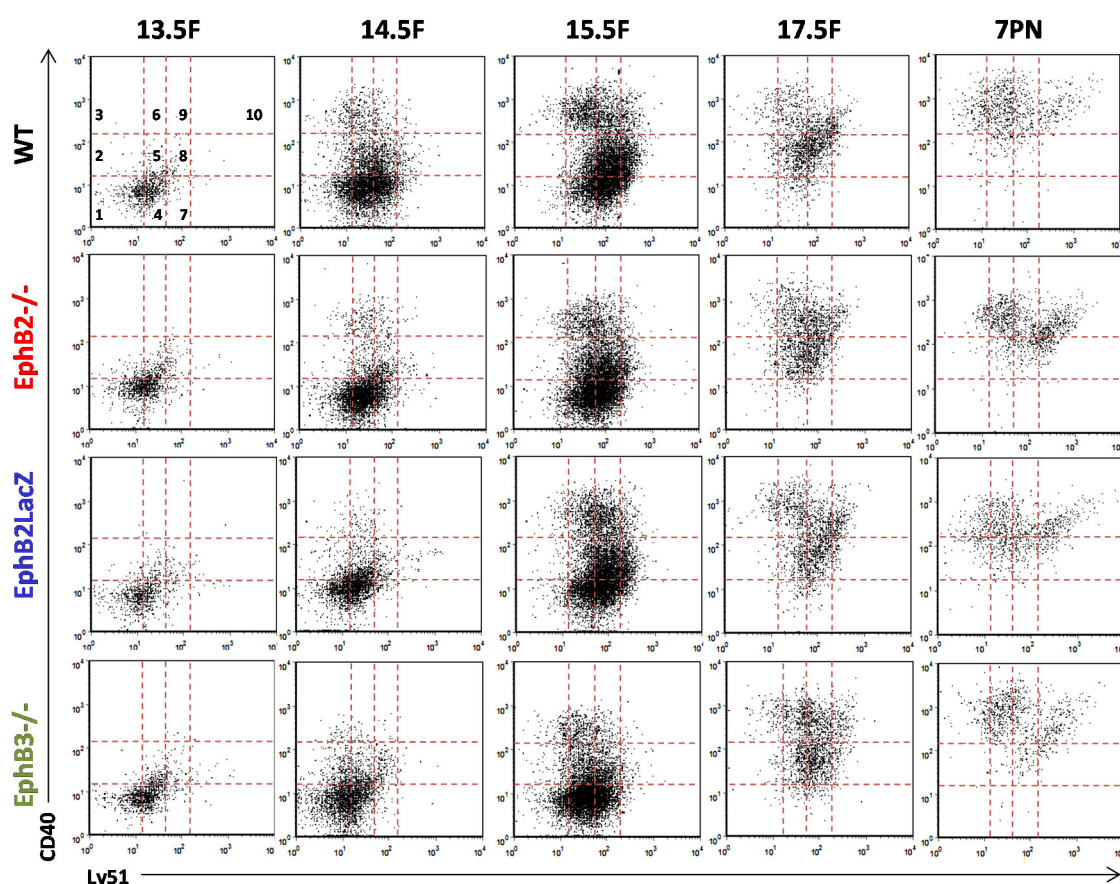


Figura 65. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores CD40 y Ly51 durante el desarrollo embrionario (13.5F-17.5F) y 7PN en los timos WT y deficientes en EphB. Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales dentro de la población EpCAM⁺CD45⁻ en los timos EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}, según el nivel de expresión del marcador funcional CD40 y el cortical Ly51. Tal y como se observa en los *dot plots* a lo largo del desarrollo se pueden definir las mismas subpoblaciones que en los timos WT: 1=CD40^{lo}Ly51⁻, 2=CD40^{lo}Ly51^{lo}, 3=CD40^{med/hi}Ly51⁻, 4=CD40^{lo}Ly51^{med}, 5=CD40^{lo}Ly51^{hi}, 6=CD40^{med/hi}Ly51^{lo}, 7=CD40^{lo}Ly51^{med}, 8=CD40^{lo}Ly51^{hi}, 9=CD40^{med/hi}Ly51^{med} y 10=CD40^{med/hi}Ly51^{hi}. Nótese como el patrón de diferenciación experimentado en los timos mutantes es similar al observado en la condición WT, pero con ciertas diferencias. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados en cada estadio.

Al analizar la cinética de aparición y la evolución de las subpoblaciones epiteliales en los timos deficientes en EphB observábamos, una vez más, que éstas eran similares

pero no iguales a las seguidas por los WT (**Fig. 65**).

Al igual que para el análisis de las poblaciones WT analizamos la expresión de CD40 en las diferentes subpoblaciones Ly51 que aparecen a lo largo del desarrollo en los timos mutantes. La población más inmadura CD40⁺Ly51⁻ descendía entre 13.5F y 15.5F en los timos mutantes, al igual que ocurría en los timos WT (**Fig. 66**), pero todos ellos mostraban valores significativamente mayores con respecto a los WT. Esta acumulación de células mutantes, reflejo del retraso en la maduración de las células primitivas CD40⁺Ly51⁻ mutantes, correlacionaba con un descenso significativo de la población CD40⁺Ly51^{lo} a 13.5F, y en menor medida a 14.5F, donde sólo en los mutantes EphB3^{-/-} la caída era significativa (**Fig. 67**), pero no en la población minoritaria CD40^{lo}Ly51^{lo} (**Fig. 68**) a 13.5F observada en los WT, sugiriendo una relación directa entre CD40⁺Ly51⁻ y CD40^{lo}Ly51^{lo}. Tal y como sucedía en los WT, entre 14.5F y 15.5F, en los timos mutantes había una reducción muy acusada de células CD40⁺Ly51^{lo} aunque significativamente mucho menor que en los timos WT (**Fig. 67**). Esta acumulación de células CD40⁺Ly51^{lo} en mutantes, sobre todo en EphB3^{-/-} de 15.5F correlacionaba con descensos significativos de las poblaciones CD40⁺Ly51^{med} (**Fig. 69**) y CD40^{lo}Ly51^{med} mutantes (**Fig. 70**) y resaltaba la relación propuesta entre estas tres poblaciones. El comportamiento descrito en esta última subpoblación ya era observado en todos los mutantes a 14.5F (**Fig. 70**).

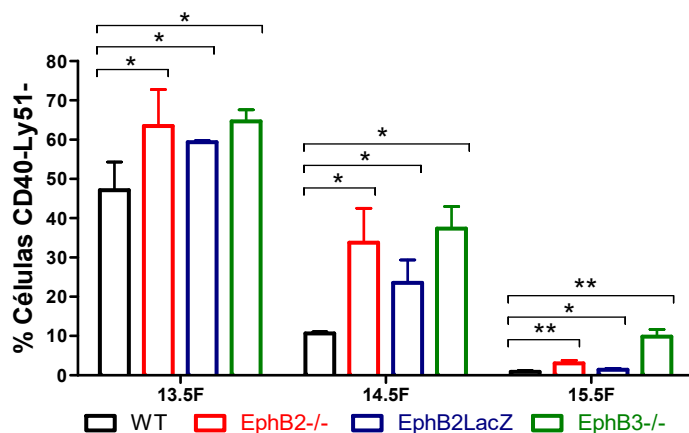


Figura 66. Evolución de la subpoblación epitelial CD40⁺Ly51⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 13.5F y 15.5F. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación CD40⁺Ly51⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como la población CD40⁺Ly51⁻ disminuye en los timos WT entre 13.5F y 15.5F; sin embargo, aunque en los timos mutantes la evolución es similar, muestran una acumulación significativa de estas células en todos los estadios respecto a los WT. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: **p*≤0.05; ***p*≤0.01 según el análisis estadístico de la *t* de Student.

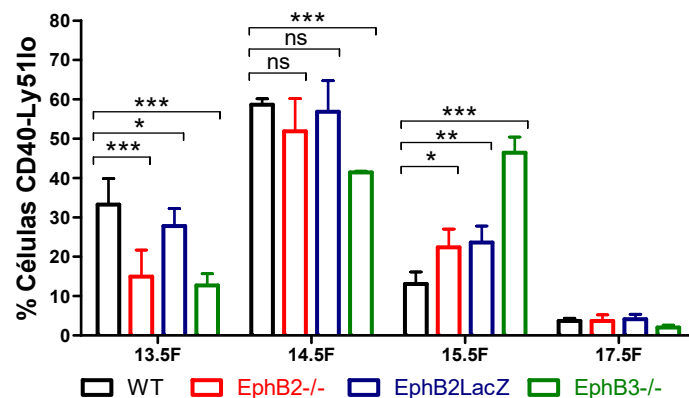


Figura 67. Evolución de la subpoblación CD40^{lo}Ly51^{lo} en timos WT y deficientes en EphB entre 13.5F y 17.5F. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación CD40^{lo}Ly51^{lo} en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como la proporción de células CD40^{lo}Ly51^{lo} aumenta entre 13.5F y 14.5F y disminuye a partir de este estadio en los timos WT. Los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ presentan un patrón similar al WT, pero no así los timos EphB3^{-/-}, que aumentan gradualmente entre 13.5F y 15.5F, para después descender bruscamente. La proporción de estas células es significativamente menor en todos los mutantes a 13.5F pero sólo en los timos EphB3^{-/-} a 14.5F. Sin embargo, a 15.5F, pero no a 17.5F, en todos ellos la proporción incrementaba significativamente respecto a los WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

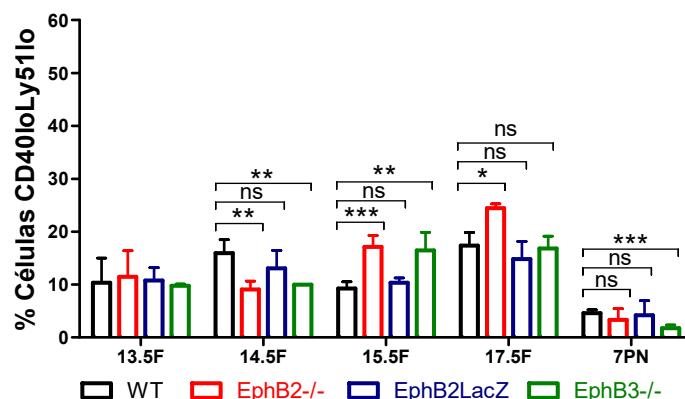


Figura 68. Evolución de la subpoblación CD40^{lo}Ly51^{lo} entre 13.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación CD40^{lo}Ly51^{lo} en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como en los timos WT, la proporción de células CD40^{lo}Ly51^{lo} es bastante constante entre 13.5F y 17.5F, disminuyendo a 7PN. Los timos mutantes EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} presentan valores significativamente menores a 14.5F y mayores a 15.5F respecto a los WT que también se mantiene a 17.5F en los timos EphB2^{-/-}. Por el contrario, no se observan diferencias en esta subpoblación en los timos EphB2LacZ, que muestra una evolución similar a los WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Por otro lado, la población que hemos considerado de transición en los timos WT, CD40^{lo}Ly51^{lo} (**Fig. 68**), mostró diferencias con respecto al patrón WT exclusivamente en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} que presentaban valores significativamente menores

a 14.5F, pero mayores a 15.5F y a 17.5F sólo en timos EphB2^{-/-}. Es difícil establecer las relaciones de esta población que presumiblemente tiene una vida corta y diferencia rápidamente pudiendo contribuir a las poblaciones CD40^{lo}Ly51^{med} y CD40^{med/hi}Ly51^{lo}. No es fácil a la vista de nuestros resultados establecer una relación directa con la población CD40⁻Ly51^{lo} que, como hemos explicado, contribuye y afecta, por tanto, las proporciones de las poblaciones CD40⁻Ly51^{med} y CD40^{lo}Ly51^{med}. Sin descartar esa relación, que parece más lógica, podría pensarse que la acumulación de células CD40⁻Ly51⁻ en los timos mutantes de 13.5F y 14.5F explicarían la caída de la proporción de CD40^{lo}Ly51^{lo} a 14.5F, mientras el aumento de la proporción de CD40^{lo}Ly51^{lo} a 15.5F y a 17.5F contribuiría también a las caídas ya indicadas en estos estadios de células CD40^{lo}Ly51^{med} (Fig. 70).

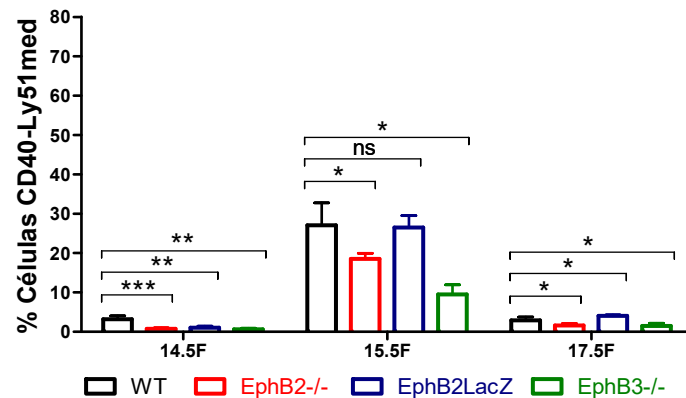


Figura 69. Evolución de la subpoblación CD40⁻Ly51^{med} en timos WT y deficientes en EphB entre 14.5F y 17.5F. La figura muestra la evolución de la subpoblación CD40⁻Ly51^{med} en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como la proporción de células CD40⁻Ly51^{med} aumenta entre 14.5F y 15.5F, para después caer tanto en timos WT como mutantes. En estos últimos, sin embargo, hay una reducción significativa de estas células a 14.5F y sólo en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} a 15.5F y a 17.5F. En este último estadio, los timos EphB2LacZ presentan un porcentaje significativamente mayor respecto a los WT. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

En este punto es necesario indicar como la falta de EphB2 y EphB3 cursaba hasta 17.5F con importantes alteraciones en la aparición de las subpoblaciones Ly51^{lo} y Ly51^{med} que no expresaban CD40 o lo hacían en niveles bajos. Sin embargo, las diferencias fueron menos acusadas en el caso de los timos EphB2LacZ, que a pesar de presentar alteraciones en la aparición de algunas subpoblaciones epiteliales mostraban cinéticas más parecidas al patrón WT.

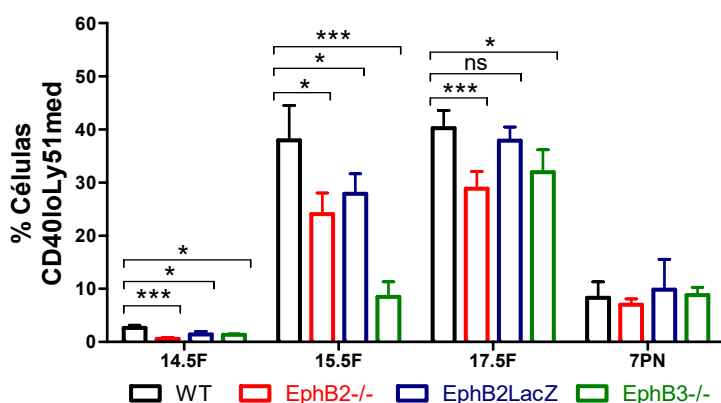


Figura 70. Evolución de la subpoblación CD40^{lo}Ly51^{med} entre 14.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. La figura muestra la evolución de la subpoblación CD40^{lo}Ly51^{med} en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2^{LacZ} y EphB3^{-/-}. Nótese como la proporción de células CD40^{lo}Ly51^{med} aumenta bruscamente entre 14.5F y 15.5F, disminuyendo a partir de 17.5F en los timos WT. Los timos EphB2^{-/-} y EphB2^{LacZ} presentan un patrón similar al WT, pero no así los timos EphB3^{-/-}, que presentan el aumento más importante entre 15.5F y 17.5F. Sin embargo, todos los timos mutantes muestran entre 14.5F y 17.5F un porcentaje significativamente menor de estas células con la excepción de los timos EphB2^{LacZ} a 17.5F. Por otro lado, a 7PN no existen diferencias respecto a los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Como hemos indicado anteriormente en los timos WT, a 17.5F la mayoría de las células epiteliales corticales Ly51^{lo} y Ly51^{med} expresaban CD40^{lo}, siendo las subpoblaciones CD40^{hi} prácticamente inexistentes (**Fig. 63**). En los timos WT entre 17.5F y 7PN incrementaba la proporción de células Ly51^{lo} y Ly51^{med} que expresaban niveles CD40^{med/hi}, además de la expansión de las células CD40^{med/hi}Ly51^{hi} y CD40^{med/hi}Ly51^{lo}. Las células CD40^{med/hi}Ly51^{lo} y CD40^{med/hi}Ly51^{med} podrían desarrollarse a partir de células CD40^{lo} que regularían positivamente la expresión de CD40, ya que entre 17.5F y 7PN ambas poblaciones CD40^{lo} disminuían considerablemente (**Fig. 63B, C**). Analizando la aparición de estas subpoblaciones CD40^{med/hi} en los mutantes observábamos que la evolución de la población CD40^{med/hi}Ly51^{lo} (**Fig. 71**) mostraba una tendencia similar a la descrita en los WT, sin diferencias aparentes al comparar con los valores WT, con la única excepción de un porcentaje significativamente menor en todos a 14.5F (**Fig. 71**) y a 15.5F en los EphB3^{-/-}, que muestra, de esta manera, su retraso en la adquisición de una mayor expresión de Ly51 (**Fig. 65**). Sin embargo, ésta es una población intermedia y las diferencias eran más evidentes en la población CD40^{med/hi}Ly51^{med} (**Fig. 72**) que a 15.5F se reducía significativamente en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero no en los EphB2^{LacZ}. Por el contrario, a 17.5F y 7PN esta población se acumulaba

significativamente en todos los mutantes, salvo a 17.5F en los timos EphB2LacZ que mostraban valores similares al WT (**Fig. 72**).

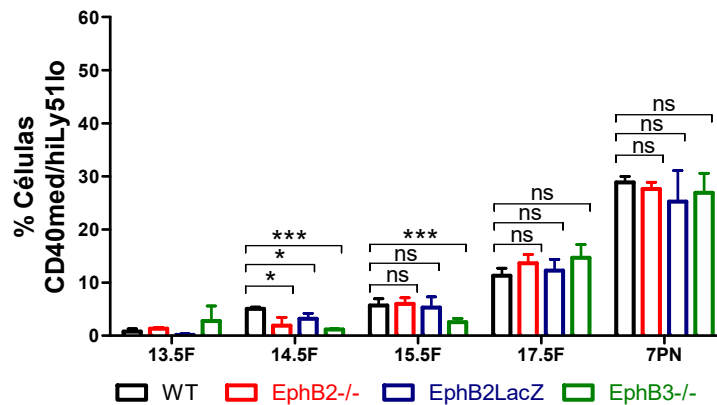


Figura 71. Evolución de la subpoblación CD40^{med/hi}Ly51^{lo} entre 13.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. La figura muestra la evolución de la subpoblación CD40^{med/hi}Ly51^{lo} en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como la proporción de células CD40^{med/hi}Ly51^{lo} aumenta gradualmente desde 13.5F hasta 7PN en los timos WT y de forma similar en los timos mutantes. Únicamente a 14.5F esta población está significativamente reducida en los timos mutantes y a 15.5F en los EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

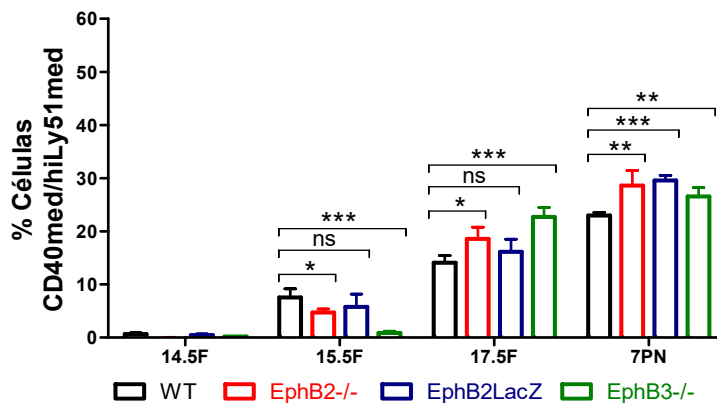


Figura 72. Evolución de la subpoblación CD40^{med/hi}Ly51^{med} entre 14.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. La figura muestra la evolución de la subpoblación CD40^{med/hi}Ly51^{med} en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como la proporción de células CD40^{med/hi}Ly51^{med} aumenta gradualmente entre 14.5F y 7PN tanto en los timos WT como en los mutantes, aunque en los EphB3^{-/-} ocurre desde 15.5F. A 15.5F los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero no los EphB2LacZ, presentan un porcentaje significativamente menor de esta subpoblación, pero significativamente mayor a 17.5F y 7PN, incluso en los EphB2LacZ que a 17.5F muestran valores similares a los WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Por otro lado, analizando a 7PN la población más cortical CD40^{med/hi}Ly51^{hi}, todos los timos mutantes mostraron un incremento significativo de la misma con respecto a los valores WT, a excepción de los timos EphB2LacZ (**Fig. 73**). Sin embargo, en todos hubo una reducción significativa en la población medular CD40^{med/hi}Ly51⁻, incluso en estos

últimos (**Fig. 74**). Este resultado indicaría que a 7PN las principales diferencias entre WT y mutantes ocurrían en las poblaciones más maduras $CD40^{med/hi}Ly51^{-}$, $CD40^{med/hi}Ly51^{hi}$ y $CD40^{med/hi}Ly51^{med}$ pero no en la subpoblación aparentemente intermedia $CD40^{med/hi}Ly51^{lo}$ (**Fig. 71**), algo similar a lo que observábamos para las subpoblaciones $Ly51^{med}UEA1^{lo/med}$ y $Ly51^{hi}UEA1^{lo/med}$ (**Fig. 46A y B** respectivamente) y $Ly51^{-}UEA1^{hi}$ (**Fig. 47C**). En definitiva que, muy probablemente en las poblaciones aquí analizadas $CD40^{med/hi}Ly51^{med}$ y $CD40^{med/hi}Ly51^{hi}$ estén incluidas en los timos mutantes células que expresan marcadores tanto corticales como medulares.

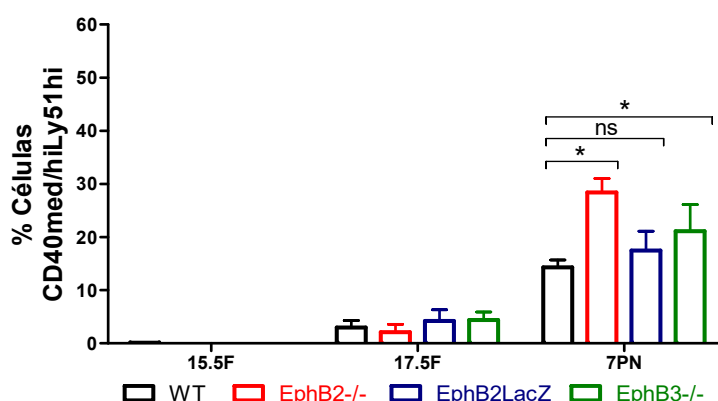


Figura 73. Evolución de la subpoblación $CD40^{med/hi}Ly51^{hi}$ en timos WT y deficientes en EphB entre 15.5F y 7PN. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación $CD40^{med/hi}Ly51^{hi}$ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como aumenta la proporción de estas células en los timos WT y mutantes entre 15.5F y 7PN. Únicamente a 7PN los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} presentan valores significativamente mayores de esta subpoblación respecto a los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la t de Student.

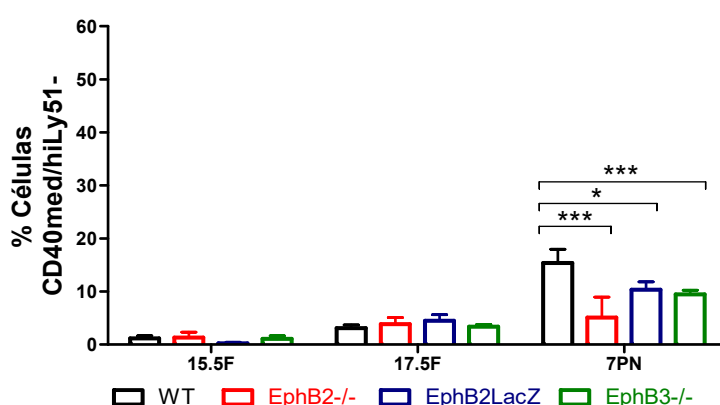


Figura 74. Evolución de la subpoblación $CD40^{med/hi}Ly51^{-}$ en timos WT y deficientes en EphB entre 15.5F y 7PN. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación $CD40^{med/hi}Ly51^{-}$ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese el aumento de la proporción de estas células en los timos WT y mutantes, aunque con algunas diferencias a 7PN en estos últimos, que presentan valores significativamente menores respecto a los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Para analizar el efecto que la falta de cada una de las EphB podía tener en la aparición y desarrollo de las diferentes subpoblaciones epiteliales corticales comparamos, una vez más, los porcentajes de estas subpoblaciones entre los timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} en los distintos estadios analizados. En el caso de la población CD40⁺Ly51⁻, los timos EphB2LacZ tenían valores ligeramente menores que los EphB2^{-/-} (**Fig. 75A**). Este hecho correlacionaba con un aumento no significativo de la población CD40⁺Ly51^{lo} entre 13.5F y 14.5F (**Fig. 75B**) y significativo de la población CD40⁺Ly51^{med} a 15.5F y 17.5F (**Fig. 75C**). En el caso de la población transitoria CD40^{lo}Ly51^{lo}, observábamos que a 14.5F los timos EphB2LacZ presentaban una proporción significativamente mayor de estas células que los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 75D**), luego sus valores variaban poco hasta caer a 7PN. Por el contrario, en el caso de EphB2^{-/-}, los valores iban acumulándose desde 14.5F a 17.5F, siendo significativamente mayores que los de EphB2LacZ (**Fig. 75D**). Ambos resultados correlacionaban con la evolución de la siguiente población CD40^{lo}Ly51^{med}, con valores máximos en EphB2LacZ y caída de los de EphB2^{-/-} a 17.5F (**Fig. 75E**). Por otro lado, en aquellas subpoblaciones CD40^{med/hi} que expresan diferencialmente Ly51: CD40^{med/hi}Ly51^{lo} (**Fig. 76A**), CD40^{med/hi}Ly51^{med} (**Fig. 76B**), CD40^{med/hi}Ly51^{hi} (**Fig. 76C**) y CD40^{med/hi}Ly51⁻ (**Fig. 76D**), no había diferencias entre ambos tipos de mutantes, excepto una proporción significativamente mayor de células CD40^{med/hi}Ly51^{hi} a 7PN en los EphB2^{-/-} (**Fig. 76C**). Estos resultados demuestran que las principales diferencias entre EphB2^{-/-} y EphB2LacZ se advertían en las poblaciones que no expresaban CD40 o lo hacían con niveles bajos de CD40^{lo}, pero no en aquellas que ya expresaban CD40^{med/hi}. Además, estos resultados demostrarían, una vez más, que la falta de EphB2 induce un retraso mayor en la maduración de estas subpoblaciones epiteliales que en las células EphB2LacZ, lo que pone de relieve la importancia de la recuperación de la señalización *reverse* en los timos EphB2LacZ para mejorar parcialmente la maduración temprana de las células epiteliales corticales, aunque sin recuperar el fenotipo WT.

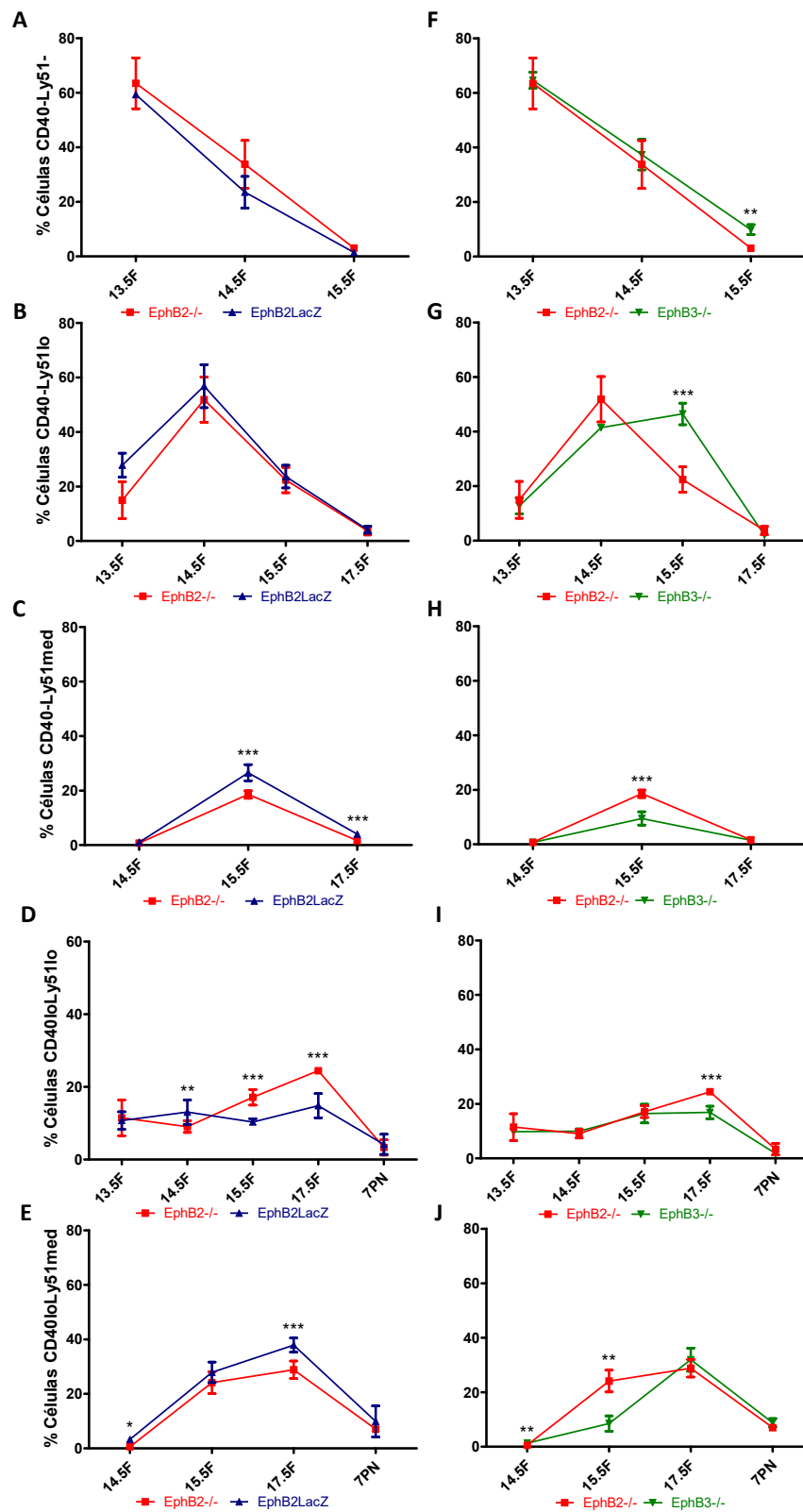


Figura 75. Análisis comparado de la evolución de las subpoblaciones CD40⁺ y CD40^{lo} en las células Ly51 entre timos fetales y postnatales EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje mayor de células CD40⁺Ly51⁺ **(A)** entre 13.5F y 14.5F, aunque no significativo respecto a los timos EphB2LacZ, que correlaciona con un menor porcentaje de células CD40⁺Ly51^{lo} **(B)** en los mismos estadios. Además, los timos EphB2^{-/-} tienen un porcentaje significativamente menor de células CD40⁺Ly51^{med} entre 15.5F y 17.5F **(C)** y a 14.5F de células CD40^{lo}Ly51^{lo} **(D)**, siendo a 15.5F y 17.5F mayor respecto de los valores EphB2LacZ, que correlaciona con un menor porcentaje de células CD40^{lo}Ly51^{med} **(E)**. Por otro lado, al comparar con los timos EphB3^{-/-}, los EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor de células CD40⁺Ly51⁺ a 15.5F **(F)**, y de células CD40⁺Ly51^{lo} **(G)**, pero mayor de células CD40⁺Ly51^{med} **(H)**. Además, los timos EphB2^{-/-} tienen un porcentaje significativamente mayor de células CD40^{lo}Ly51^{lo} **(I)** a 17.5F respecto a los EphB3^{-/-}, y significativamente mayor a 15.5F en la población CD40^{lo}Ly51^{med} **(J)**. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Al comparar la evolución de estas subpoblaciones epiteliales entre los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, observábamos una mejor diferenciación del epitelio EphB2^{-/-} que del EphB3^{-/-} en algunos estadios y subpoblaciones estudiadas. En efecto, cuando se comparan los valores entre timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} se observaba que globalmente el retraso de la maduración funcional del epitelio cortical, evaluada mediante análisis de la aparición y evolución del co-estimulador CD40, era mayor en los ratones deficientes para EphB3. Así, los valores de CD40⁺Ly51⁺ **(Fig. 75F)** eran significativamente más altos en EphB3^{-/-} a 15.5F, y mientras, en EphB2^{-/-} se alcanzaban valores máximos de CD40⁺Ly51^{lo} **(Fig. 75G)** a 14.5F, en EphB3^{-/-} esto ocurría a 15.5F. Por el contrario, en las poblaciones más maduras siempre las proporciones mayores correspondían a los timos EphB2^{-/-}: a 15.5F en CD40⁺Ly51^{med} **(Fig. 75H)**; a 17.5F en CD40^{lo}Ly51^{lo} **(Fig. 75I)**; a 15.5F en CD40^{lo}Ly51^{med} **(Fig. 75J)**, CD40^{med/hi}Ly51^{lo} **(Fig. 76E)** y CD40^{med/hi}Ly51^{med} **(Fig. 76F)**. No había diferencias significativas en los valores de las poblaciones más maduras **(Fig. 76G, H)**. Estos resultados indicarían, de nuevo, que las principales diferencias existentes entre los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} son más claras en los estadios más tempranos del desarrollo (15.5F), y no en aquellos en los que CD40 alcanza una expresión med/hi.

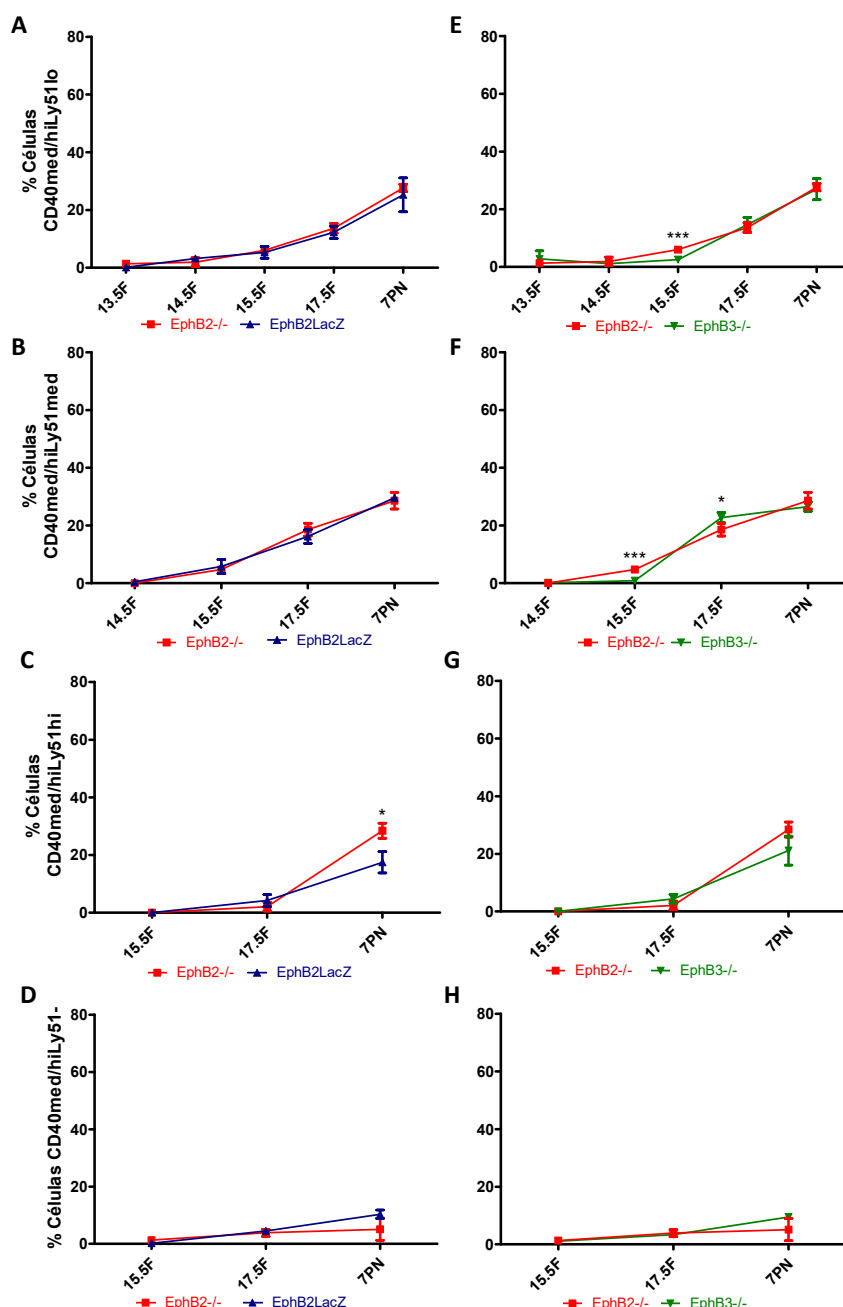


Figura 76. Análisis comparado de la evolución de las subpoblaciones CD40^{med/hi} en las células Ly51 entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} durante la ontogenia tardía y 7PN. Al comparar los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ no se observan diferencias en las subpoblaciones CD40^{med/hi}Ly51^{lo} (A), CD40^{med/hi}Ly51^{med} (B), CD40^{med/hi}Ly51^{hi} (C) y CD40^{med/hi}Ly51^{hi} (D), excepto a 7PN en la subpoblación CD40^{med/hi}Ly51^{hi} (C), donde los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor. En cambio, al comparar entre timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, los EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor de células CD40^{med/hi}Ly51^{lo} (E) y CD40^{med/hi}Ly51^{med} (F) a 15.5F, pero menor a 17.5F en esta última subpoblación. No se observan diferencias significativas en las subpoblaciones CD40^{med/hi}Ly51^{hi} (G) y CD40^{med/hi}Ly51^{hi} (H). Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

En resumen, estos resultados sugieren que las principales diferencias entre mutantes se observan en aquellas subpoblaciones epiteliales corticales que no expresan CD40 o lo hacen débilmente (CD40^{lo}). Por otro lado, la falta de EphB2 resulta, en general, en un fenotipo más severo que el de EphB2LacZ, que muestra valores más parecidos a los WT, sugiriendo la importancia de la señal *forward* pero también de la *reverse* para el control de la maduración del epitelio tímico. Por último, nuestros resultados parecen indicar que el fenotipo sería más severo en ausencia de EphB3 que de EphB2.

1.5.3. Poblaciones definidas por la expresión de Ly51 y MHCII

Continuando con la caracterización del epitelio tímico cortical en ausencia de EphB2 o EphB3 combinamos la expresión de Ly51 con la del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII), otro marcador de funcionalidad del epitelio tímico tanto cortical como medular. Nuestro estudio comenzó a 12.5F, y tal como muestra la **Figura 77**, la expresión de MHCII en el timo WT se modulaba positivamente a lo largo del desarrollo definiendo distintas subpoblaciones: negativa (-: 1, 5, 9), *low* (lo: 2, 6, 10), *medium* (med: 3, 7, 11) y *high* (hi: 4, 8, 12, 13) en base a sus niveles de expresión y cuya evolución en combinación con la expresión de Ly51 también se muestra en la **Figura 78A-C**.

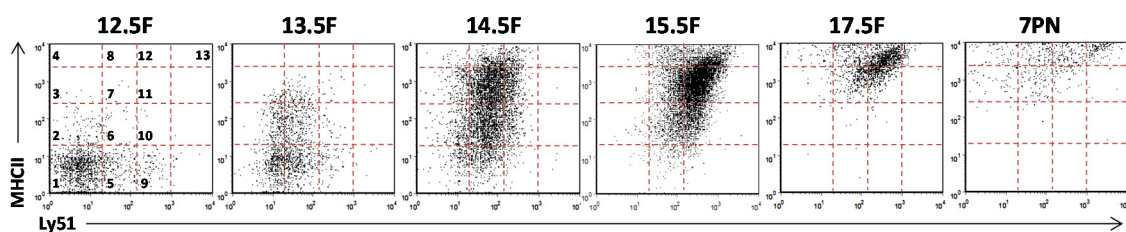


Figura 77. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores MHCII y Ly51 en timos fetales (12.5F-17.5F) y 7PN WT. Dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻ en los timos WT se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales según la expresión del marcador funcional MHCII y el cortical Ly51. Tal y como muestran los *dot plots*, a lo largo del desarrollo se definen las siguientes subpoblaciones: 1=MHCII⁻Ly51⁻; 2=MHCII^{lo}Ly51⁻; 3=MHCII^{med}Ly51⁻; 4=MHCII^{hi}Ly51⁻; 5=MHCII⁻Ly51^{lo}; 6=MHCII^{lo}Ly51^{lo}; 7=MHCII^{med}Ly51^{lo}; 8=MHCII^{hi}Ly51^{lo}; 9=MHCII⁻Ly51^{med}; 10=MHCII^{lo}Ly51^{med}; 11=MHCII^{med}Ly51^{med}; 12=MHCII^{hi}Ly51^{med}; 13=MHCII^{hi}Ly51^{hi}. Nótese la regulación positiva de ambos marcadores a lo largo del desarrollo. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados para cada estadio.

En la **Figura 78** se subdividen estas poblaciones en tres grandes apartados correspondientes a células Ly51⁻ (**Fig. 78A**), Ly51^{lo} (**Fig. 78B**) y Ly51^{med} y Ly51^{hi} (**Fig. 78C**). Entre 12.5F y 13.5F la población Ly51⁻ incluía principalmente células MHCII⁻ y

algunas que comenzaban a expresar la molécula MHCII ($\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^-$) (**Fig. 78A**). Esta última población $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^-$ disminuía a 15.5F coincidiendo con el inicio de las subpoblaciones $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^-$ y $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^-$, que corresponden a TEC medulares maduras, y alcanzan un cierto valor a 7PN (**Fig. 78A**). En definitiva, las poblaciones Ly51^- incluyen básicamente células MHCII⁻ que desaparecen entre 12.5F y 15.5F, y un pequeño número, a partir de 17.5F, de TEC medulares $\text{MHCII}^{\text{med}}$ y MHCII^{hi} . A 12.5F, las primeras células Ly51^{lo} que aparecían no expresaban MHCII (**Fig. 78B**), por lo que la expresión de Ly51 aparecería antes que la del marcador funcional MHCII en las células corticales. A 13.5F la población $\text{MHCII}^- \text{Ly51}^{\text{lo}}$ (**Fig. 78B**) incrementaba pero volvía a disminuir entre 14.5F y 17.5F debido a la aparición las células $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ y $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ que aumentaban hasta 14.5F (**Fig. 78B**). Ambas subpoblaciones disminuyeron a 15.5F debido a la aparición de las células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ (**Fig. 78C**). Hay que destacar que la proporción de células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ incrementaba entre 12.5F y 14.5F para descender a 15.5F y mantenerse prácticamente constante hasta 7PN, mientras que las células $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ aumentaban hasta 14.5F pero desaparecieron a 17.5F (**Fig. 78B**). Por otro lado, a partir de 15.5F y hasta 7PN aumentaba la población $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ posiblemente a partir de las células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ (**Fig. 78B**).

Las poblaciones Ly51^{med} y Ly51^{hi} (**Fig. 78C**) comenzaban a aumentar a partir de 14.5F, coincidiendo con el descenso de las subpoblaciones Ly51^{lo} (**Fig. 78B**). A 15.5F la población mayoritaria era $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ (**Fig. 78C**), que aparece un estadio después de la aparición de las células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$. Esta población disminuyó gradualmente hasta 7PN, posiblemente debido al incremento de la población $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ que sucedía a 17.5F, después de la aparición de las células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ (15.5F, **Fig. 78C**). Sin embargo, las células $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ disminuyeron a partir de 17.5F como consecuencia del incremento de la población cortical más madura $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{hi}}$ (**Fig. 78C**). Por último, la población $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ estaba muy poco representada durante el desarrollo (**Fig. 78C**) apareciendo sólo a 15.5F en muy baja proporción, por lo que puede considerarse un estadio de transición de corta vida entre las células $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ y las $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{med}}$. En resumen, podemos concluir que a 7PN se identifican las siguientes poblaciones corticales $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$, $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$,

MHCII^{hi}Ly51^{med}, MHCII^{hi}Ly51^{hi} y en menor proporción MHCII^{med}Ly51^{med}. Por último, había dos poblaciones Ly51⁻ que formarían parte de la población medular: MHCII^{med}Ly51⁻ y MHCII^{hi}Ly51⁻, con baja representación en los primeros estadios y que sólo incrementaban a 7PN.

Estos datos mostraban como conforme avanzaba el desarrollo la maduración de las células Ly51⁺ WT iba asociada a la adquisición del marcador MHCII, de manera que en el timo postnatal todas las células corticales independientemente que expresen más o menos fuertemente Ly51 son células MHCII^{med/hi} (Fig. 77).

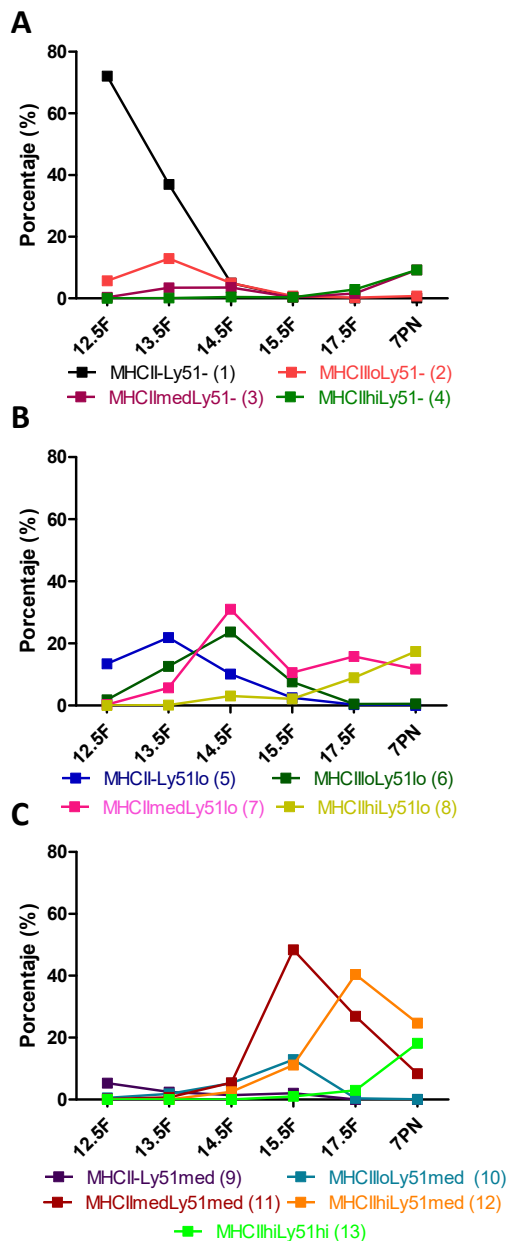


Figura 78. Evolución de las distintas subpoblaciones epiteliales MHCII en relación a la expresión de Ly51 en timos WT durante el desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) y 7PN.

Las gráficas muestran la evolución de las distintas subpoblaciones MHCII en base a la expresión de Ly51: Ly51⁻ (A), Ly51^{lo} (B), Ly51^{med} y Ly51^{hi} (C). (A) Tal y como muestran las gráficas la subpoblación mayoritaria a 12.5F, MHCII⁻Ly51⁻, disminuye bruscamente mientras que el resto de subpoblaciones MHCII son prácticamente inexistentes con la excepción de una pequeña proporción de células MHCII^{med}Ly51⁻ y MHCII^{hi}Ly51⁻ a 7PN. (B) Por otro lado, las subpoblaciones que expresan Ly51^{lo} al principio del desarrollo son MHCII⁻, y según éste avanza, van regulando positivamente este marcador, apareciendo primeramente MHCII^{lo} y MHCII^{med} y más tarde MHCII^{hi} pero sin apreciar células MHCII⁻Ly51^{lo} y MHCII^{lo}Ly51^{lo} a 7PN. (C) Por último, a partir de 14.5F, comienza la aparición de células MHCII^{med}Ly51^{med} y MHCII^{hi}Ly51^{med} que descienden a partir de 17.5F cuando incrementa la subpoblación madura final MHCII^{hi}Ly51^{hi}.

A la vista de la aparición y evolución durante el desarrollo de estas poblaciones, proponemos el siguiente esquema para el linaje epitelial tímico definido por los marcadores Ly51 y MHCII (**Fig. 79**), de igual forma que en el caso de las poblaciones definidas por Ly51 y CD40, debido al dinamismo de los estadios intermedios.

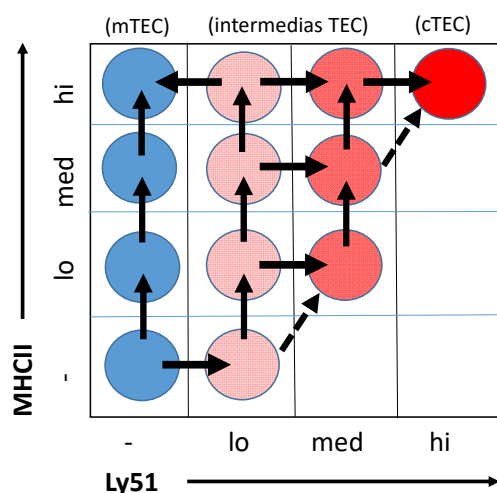


Figura 79. Posible esquema de la aparición de las diferente subpoblaciones epiteliales definidas por la expresión de MHCII y Ly51 de acuerdo a los datos de su evolución descrita en las Figuras 77 y 78.

Al analizar la cinética de aparición y la evolución de las subpoblaciones epiteliales descritas en los timos WT en los timos deficientes en EphB (**Fig. 80**) observábamos que, una vez más, eran similares pero con relevantes diferencias.

Así, la población más inmadura MHCII⁻Ly51⁻ (**Fig. 81**) mostraba valores significativamente mayores en todos los mutantes desde 13.5F y hasta 15.5F aunque en menor medida en el caso de EphB2LacZ a 13.5F y 14.5F. Sin embargo, no observábamos diferencias a 12.5F cuando todavía el epitelio tímico no expresaba o lo hacía mínimamente ni MHCII ni Ly51.

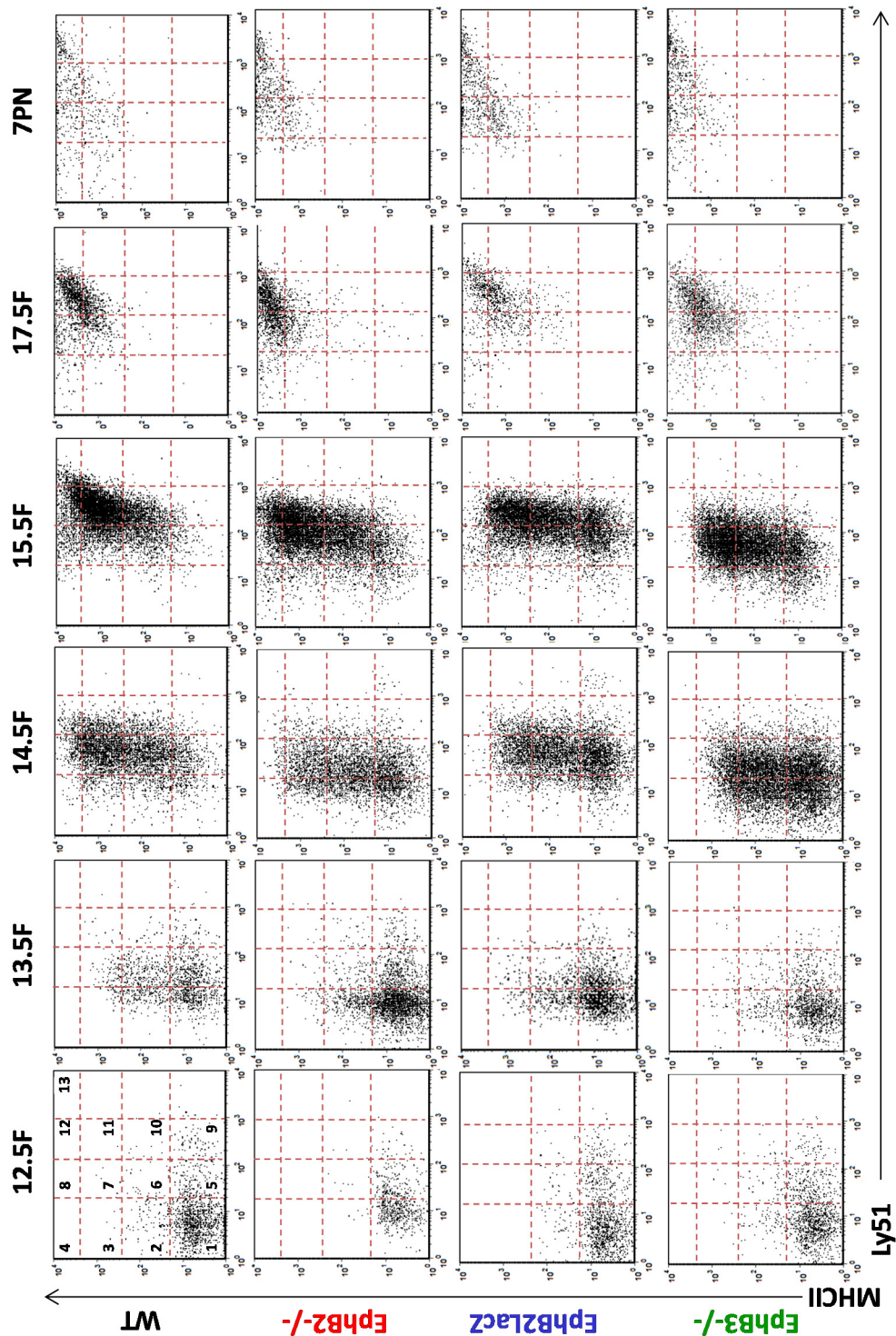


Figura 80. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores MHCII y Ly51 durante el desarrollo embrionario (12.5F-17.5F) y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales en base a la expresión de MHCII y Ly51 dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁺ en los timos EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} en comparación con los WT. Tal y como muestran los *dot plots* a lo largo del desarrollo se definen las mismas subpoblaciones que en los timos WT: 1=MHCII^{lo}Ly51^{hi}; 2=MHCII^{lo}Ly51^{lo}; 3=MHCII^{med}Ly51^{hi}; 4=MHCII^{hi}Ly51^{hi}; 5=MHCII^{lo}Ly51^{med}; 6=MHCII^{lo}Ly51^{lo}; 7=MHCII^{med}Ly51^{lo}; 8=MHCII^{hi}Ly51^{lo}; 9=MHCII^{lo}Ly51^{med}; 10=MHCII^{lo}Ly51^{med}; 11=MHCII^{med}Ly51^{med}; 12=MHCII^{hi}Ly51^{med}; 13=MHCII^{hi}Ly51^{hi}. Nótese como el patrón de diferenciación experimentado en los timos mutantes es similar al observado en la condición WT, aunque existen diferencias con respecto a estos últimos. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados para cada estadio.

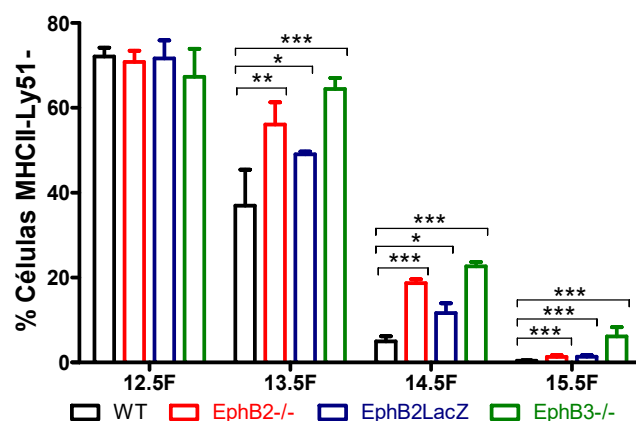
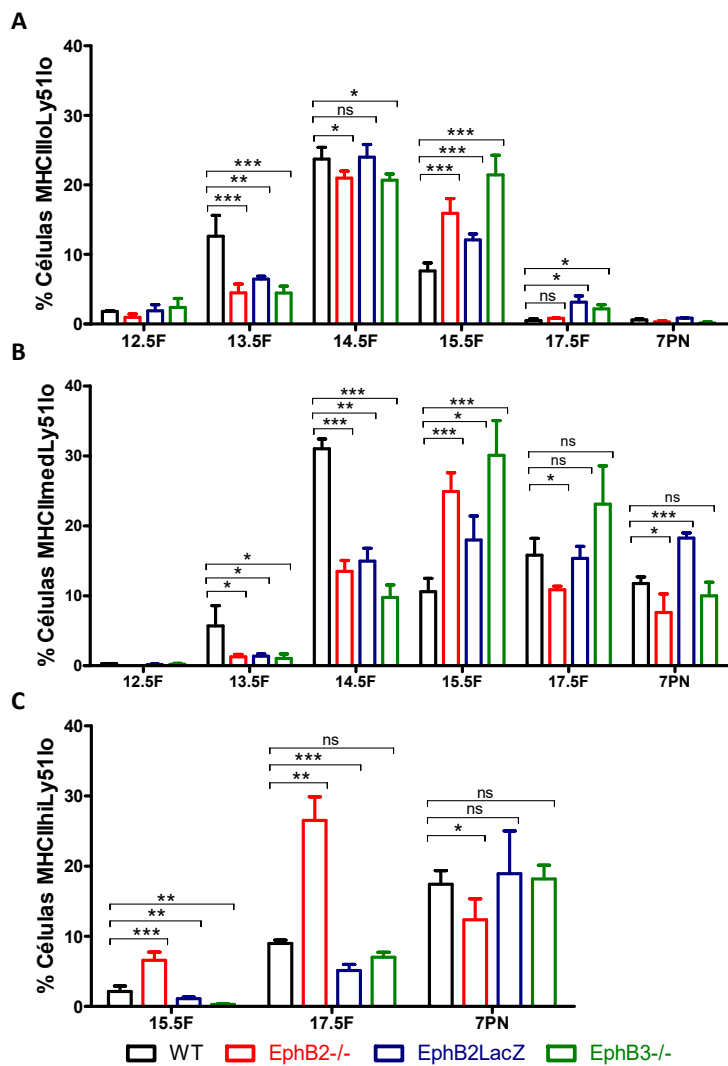


Figura 81. Evolución de la subpoblación epitelial MHCII⁺Ly51⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 15.5F. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación MHCII⁺Ly51⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Nótese como la población MHCII⁺Ly51⁻ en los timos WT disminuye considerablemente desde 12.5F hasta desaparecer prácticamente a 15.5F. Los timos mutantes también muestran esa disminución pero es mucho menor y sus valores son significativamente más altos que los WT hasta 15.5F. Nótese que entre 13.5F y 14.5F las diferencias son más evidentes en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} que en los EphB2LacZ. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

La evolución de las poblaciones Ly51^{lo} intermedias que acompañarían la maduración del epitelio cortical, según el esquema propuesto, fue semejante en términos generales a la de los WT respecto a las dos primeras subpoblaciones MHCII^{lo}Ly51^{lo} y MHCII^{med}Ly51^{lo}, especialmente hasta 15.5F (**Fig. 82A, B**). En ambos casos, los mutantes mostraban valores más bajos que los WT a 13.5F y 14.5F, y aumento por encima de los valores WT a 15.5F, siendo la significación mucho más evidente en el caso de la población MHCII^{med}Ly51^{lo} (**Fig. 82B**) y pareciendo el retraso en la maduración de las poblaciones más evidente en los timos EphB3^{-/-} que en EphB2^{-/-}. A partir de este estadio, la población MHCII^{lo}Ly51^{lo} desaparecía completamente en los timos mutantes al igual que sucedía en los WT, aunque a 17.5F los valores todavía eran significativamente más altos en los EphB2LacZ y EphB3^{-/-} respecto a los WT (**Fig. 82A**). En el caso de la población MHCII^{med}Ly51^{lo}, las células EphB2^{-/-} disminuyen significativamente por debajo de los valores WT a 17.5F (**Fig. 82B**), pero no así las EphB2LacZ y EphB3^{-/-}.



especialmente EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, alcanzan su valor máximo después (15.5F) correlacionando con un porcentaje significativamente menor de esta población entre 13.5F y 14.5F, pero mayor a 15.5F respecto de los timos WT. A partir de este estadio las diferencias afectan de forma diferencial a los distintos mutantes. Los timos EphB2^{-/-} muestran una reducción significativa de esta subpoblación a 17.5F y 7PN, en los EphB2LacZ aumenta significativamente a 7PN, mientras que los EphB3^{-/-} no muestran diferencias. (C) Las células MHCII^{hi}Ly51^{lo} aumentan en los timos WT entre 15.5F y 7PN, así como en los EphB2LacZ y EphB3^{-/-}, pero no en los EphB2^{-/-} donde aumenta bruscamente entre 15.5F y 17.5F para después descender. Debido a esto, los EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor de estas células a 15.5F y 17.5F, y menor a 7PN respecto de los WT, mientras que los EphB2LacZ y EphB3^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor a 15.5F y sólo EphB2LacZ a 17.5F. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.005 según el análisis estadístico de la t de Student.

A 7PN cuando la población MHCII^{med}Ly51^{lo} caía en los WT, en los timos EphB2^{-/-} también lo hacía manteniendo diferencias significativas entre ellos. No sucedía así en los EphB2LacZ que se mantenían (Fig. 82B). Aparentemente estos resultados sugerían que la maduración de la población MHCII^{med}Ly51^{lo} estaba acelerada en los timos EphB2^{-/-}; sin embargo, en un análisis más riguroso deberíamos de considerar los

estadios en los que cada timo alcanza el máximo número de células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ y como era su patrón de “subida y bajada” a lo largo del desarrollo. Los mutantes mostraban un retraso en alcanzar los valores máximos (a 14.5F los WT y a 15.5F los mutantes), y tales valores suben y bajan más rápidamente en los timos WT, mientras los mutantes lo hacen de manera más gradual; como los valores máximos en los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ son menores que los de $\text{EphB3}^{-/-}$, parecen que muestran comportamientos distintos, pero los dos muestran retrasos similares. Los timos EphB2LacZ tienen los porcentajes máximos, aunque más bajos que $\text{EphB2}^{-/-}$ y aunque a 17.5F sus valores se equiparan con los WT, su evolución tampoco es exactamente igual.

Mientras la población $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ (**Fig. 82C**) aumentaba gradualmente desde 15.5F en los timos WT, en los EphB2LacZ y $\text{EphB3}^{-/-}$ lo hacía igual, aunque más lentamente con valores significativamente menores a 15.5F. En el caso de los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ la población era significativamente más alta que la WT los primeros días (15.5F, 17.5F) para caer significativamente después a 7PN (**Fig. 82C**). Estos valores significativamente bajos de los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ de 7PN podrían reflejar la diferenciación de algunas células $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ a estadios más maduros, contribuyendo así a la población cTEC madura. Más posible sería que estas células representaran una población transitoria hacia células medulares $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{hi}}$; serían entonces células progenitoras de mTEC, como la población antes descrita $\text{Ly51}^{\text{lo}}\text{UEA1}^{\text{hi}}$ (**Ver Fig. 47**), que se acumularían a 15.5F y 17.5F porque en ausencia de EphB2 la maduración mTEC está retrasada, resultando en la caída de su porcentaje observado a 7PN.

La acumulación de células $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ (**Fig. 82A**), pero principalmente de la población $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{lo}}$ (**Fig. 82B**), observada a 15.5F en todos los timos mutantes correlacionaba con un retraso tanto en la aparición de la subpoblación $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ como en la $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ a 14.5F y 15.5F, excepto en los timos EphB2LacZ (**Fig. 83A**) a 14.5F y 15.5F en la primera, y sólo a 14.5F en la segunda (**Fig. 83B**). Puesto que los valores WT de esta población subían mucho a 15.5F, las diferencias con los mutantes eran muy significativas. Los valores $\text{EphB2}^{-/-}$ caen fuertemente a 17.5F, pero no los de EphB2LacZ y $\text{EphB3}^{-/-}$, que alcanzaban valores altos después (17.5F) de que lo hagan los WT (15.5F). A 7PN todos los valores se igualaban (**Fig. 83B**).

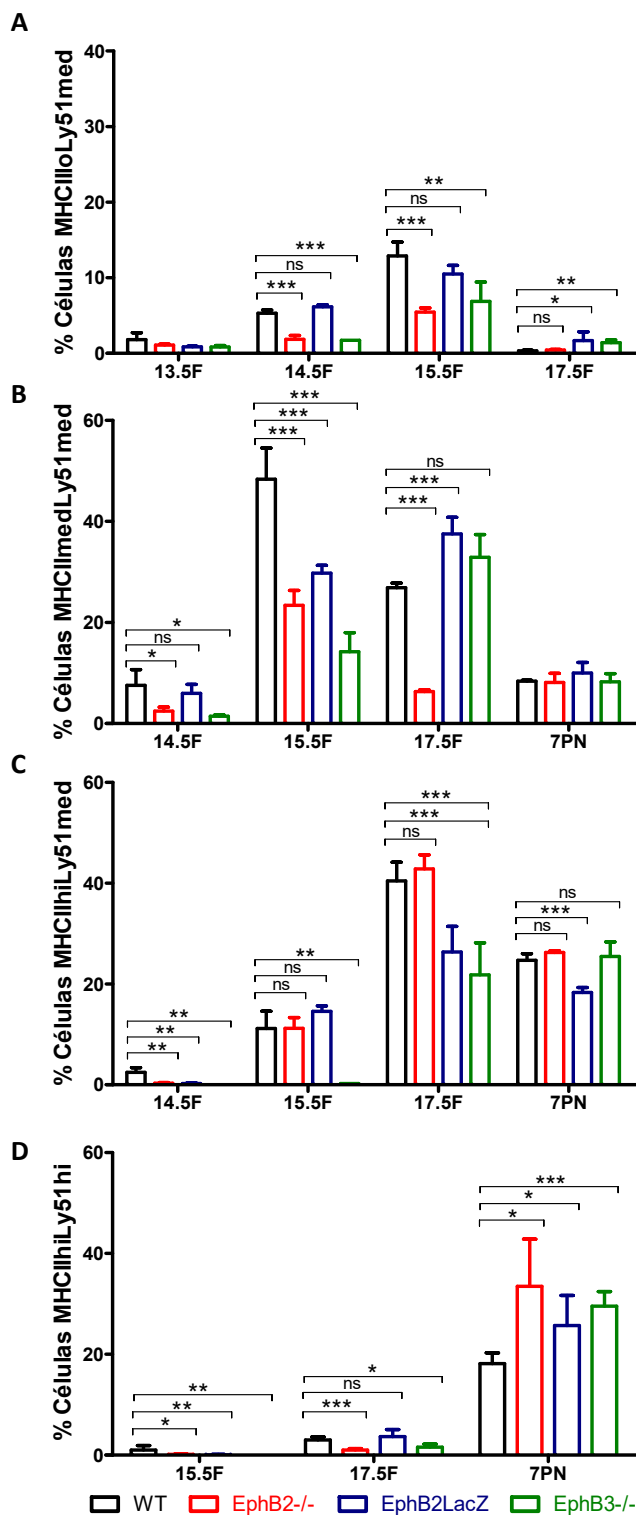


Figura 83. Evolución de las subpoblaciones MHCII^{lo}Ly51^{med} entre 13.5F y 17.5F, MHCII^{med}Ly51^{med} y MHCII^{hi}Ly51^{med} entre 14.5F y 7PN y MHCII^{hi}Ly51^{hi} entre 15.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones MHCII^{lo}Ly51^{med} (A), MHCII^{med}Ly51^{med} (B), MHCII^{hi}Ly51^{med} (C) y MHCII^{hi}Ly51^{hi} (D) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. **(A)** En los timos WT la proporción de células MHCII^{lo}Ly51^{med} aumenta entre 13.5F y 15.5F para disminuir a partir de ese estadio. Los mutantes siguen el mismo patrón, aunque los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} tienen respecto a los WT un porcentaje significativamente menor a 14.5F y 15.5F. En cambio, a 17.5F los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-} tienen porcentajes significativamente mayores respecto a los WT. **(B)** La proporción de células MHCII^{med}Ly51^{med} WT aumenta entre 14.5F y 15.5F y desciende a partir de ese estadio. Los timos EphB2^{-/-} siguen el mismo patrón WT, pero con valores significativamente más bajos en todos los estadios analizados excepto a 7PN. La situación es igual en los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-} pero el aumento de la población se extiende hasta 17.5F para descender a 7PN. Así, los primeros muestran valores significativamente más bajos a 15.5F y más altos a 17.5F con respecto a los valores WT; en cambio los segundos, presentan porcentajes significativamente menores a 14.5F y 15.5F pero no en estadios posteriores. En estos ratones el retraso en la maduración es mayor que el mostrado por los deficientes en EphB2^{-/-}. **(C)** La proporción de células MHCII^{hi}Ly51^{med} en los timos WT aumenta alcanzando los valores más altos a 17.5F, para después disminuir a 7PN. Los EphB2^{-/-} tienen una cinética bastante similar a la WT, incluso con valores muy parecidos excepto a 14.5F. En los timos EphB2LacZ, la proporción de estas células aumenta hasta 17.5F, pero por debajo de los valores WT, cayendo a 7PN. En cambio, los EphB3^{-/-} presentan valores significativamente muy bajos en todos los estadios analizados en comparación con los WT, excepto a 7PN. **(D)** La proporción de células

MHCII^{hi}Ly51^{hi} aumenta desde 15.5F a 7PN en los timos WT, al igual que ocurre en los mutantes, pero en estos últimos el porcentaje de células a 7PN es significativamente mayor, sin embargo, en estadios anteriores son significativamente menores respecto a los WT, excepto en los timos EphB2LacZ a 17.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

La reducción observada en la población $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ en los timos mutantes a 14.5F y 15.5F correlacionaba con un descenso significativo de las células $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{med}}$ a 14.5F, mientras que en el resto de estadios esta población intermedia en la progresión a las cTEC funcionalmente maduras mostraba valores muy similares a los WT, aunque con ligeras diferencias, fundamentalmente a 17.5F en EphB2LacZ y EphB3-/- (**Fig. 83C**), mostrando los timos EphB2-/- un comportamiento muy distinto al de resto de mutantes. Por último, hubo diferencias significativas en la aparición y evolución de la población epitelial cortical más madura $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^{\text{hi}}$ (**Fig. 83D**) donde, a diferencia de los timos WT, había significativamente un retraso inicial en su aparición en todos los mutantes a 15.5F y a 17.5F, excepto para EphB2LacZ en este último estadio, y una acumulación significativa a 7PN en los tres mutantes.

Aunque volveremos sobre el tema al analizar las poblaciones medulares que expresan UEA1 y MHCII, nuestros resultados demuestran que la población Ly51^+ , presumiblemente medular, también regulaba la expresión del marcador MHCII durante el desarrollo (**Fig. 77**), aunque no había grandes diferencias entre los timos WT y deficientes en EphB en esos estadios (12.5F-17.5F) (datos no mostrados). Sin embargo, después de la expansión de la médula a 7PN, había una reducción significativa del porcentaje de células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^+$ (**Fig. 84A**) y $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^+$ (**Fig. 84B**) en los timos mutantes respecto a los WT, que indicaba de nuevo el retraso en los mutantes en la maduración de las poblaciones epiteliales tímicas en este caso medulares.

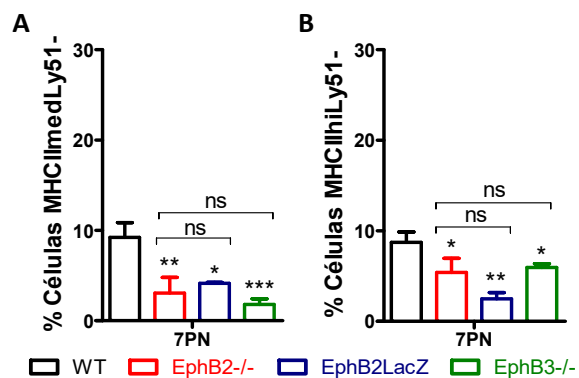


Figura 84. Análisis de los porcentajes de células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^+$ y $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^+$ a 7PN en timos WT y deficientes en EphB. Las gráficas muestran los porcentajes de las subpoblaciones $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^+$ (A) y $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^+$ (B) en los timos WT, EphB2-/- , EphB2LacZ y EphB3-/- . Nótese como la proporción de células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{Ly51}^+$ (A) y $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{Ly51}^+$ (B) es significativamente menor en los timos mutantes respecto a los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Comparamos, a continuación, la cinética de aparición de las subpoblaciones MHCII⁺ entre los mutantes EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. Por un lado, el retraso observado hasta 14.5F en la aparición de la población MHCII^{lo}Ly51^{lo} en todos los timos mutantes era mayor en los EphB2^{-/-} comparados con EphB2LacZ (**Fig. 85A**), mientras que a 15.5F presentaba valores significativamente mayores de la misma (**Fig. 85A**), porque EphB2LacZ disminuye más rápido acercándose a los WT, concluyéndose un fenotipo más severo para esta población en los timos EphB2^{-/-}. No se observaron diferencias en la población MHCII^{med}Ly51^{lo} (**Fig. 85B**) en los primeros estadios, sin embargo a 15.5F los timos EphB2^{-/-} mostraban valores significativamente más altos para ser a 17.5F y 7PN significativamente menores que los EphB2LacZ (**Fig. 85B**), en este caso, las células EphB2LacZ se mantenían prácticamente igual desde 15.5F y eran las EphB2^{-/-} las que disminuían más rápidamente.

Por último, las células MHCII^{hi}Ly51^{lo} (**Fig. 85C**) aumentaban significativamente en los timos EphB2^{-/-} a 15.5F y 17.5F, pero mostraban valores similares a los timos EphB2LacZ a 7PN. Lo que aquí sucedía es que los timos EphB2LacZ seguían un patrón muy parecido al WT, y EphB2^{-/-} otro muy distinto. Cuando comparábamos las poblaciones MHCII^{lo}Ly51^{med} (**Fig. 85D**) y MHCII^{med}Ly51^{med} (**Fig. 85E**) los timos EphB2^{-/-} presentaban valores significativamente menores desde 14.5F hasta 17.5F. Realmente el aumento de esta población se interrumpía y caía en timos EphB2^{-/-} a 17.5F y en EphB2LacZ continuaba aumentada en ese estadio; mientras la población MHCII^{hi}Ly51^{med} incrementaba significativamente en los timos EphB2^{-/-} a 17.5F y 7PN (**Fig. 85F**), sin observarse diferencias significativas entre ambos en la población más madura MHCII^{hi}Ly51^{hi} (**Fig. 85G**). Estos resultados indicaban (**ver Fig. 82, 83**) que el comportamiento de estas poblaciones era mucho más parecido al WT en los timos EphB2LacZ que en los timos EphB2^{-/-} y que mostraban fenotipos muy diferentes entre sí reflejo del retraso en la evolución de las distintas poblaciones definidas por la expresión de Ly51 y MHCII.

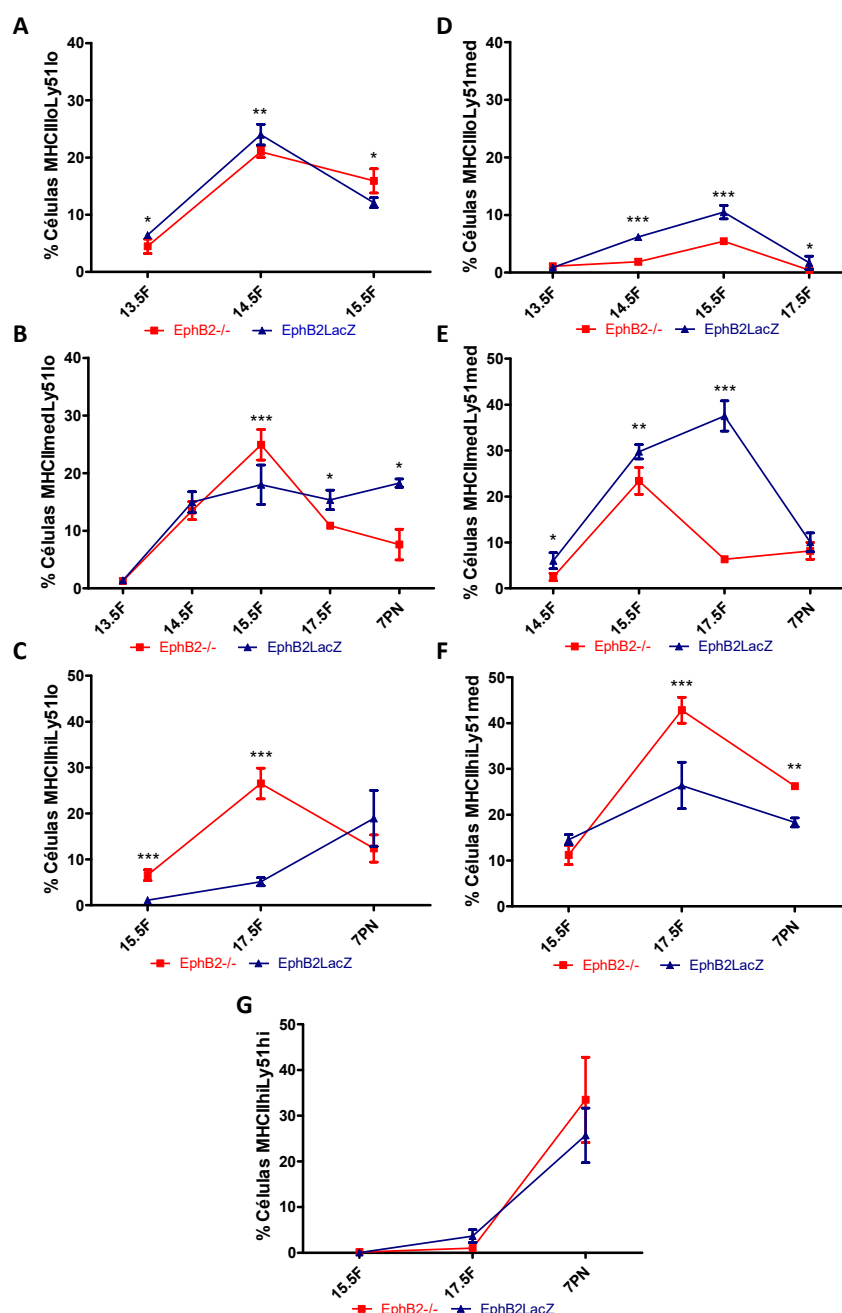


Figura 85. Análisis comparado de la evolución de las subpoblaciones MHCII^{lo}Ly51^{lo}, MHCII^{med}Ly51^{lo}, MHCII^{hi}Ly51^{lo}, MHCII^{lo}Ly51^{med}, MHCII^{med}Ly51^{med}, MHCII^{hi}Ly51^{med} y MHCII^{hi}Ly51^{hi} entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ durante la ontogenia y a 7PN. (A) El porcentaje de células MHCII^{lo}Ly51^{lo} es significativamente menor en los timos EphB2^{-/-} entre 13.5F y 14.5F respecto a los timos EphB2LacZ, pero mayor a 15.5F. (B) La proporción de células MHCII^{med}Ly51^{lo} es significativamente mayor en los timos EphB2^{-/-}, respecto a los EphB2LacZ, a 15.5F pero menor a 17.5F y 7PN. (C) La subpoblación MHCII^{hi}Ly51^{lo} en los timos EphB2^{-/-} incrementa significativamente a 15.5F y 17.5F, pero no a 7PN respecto de los valores EphB2LacZ. (D y E) Los porcentajes de células MHCII^{lo}Ly51^{med} (D) y MHCII^{med}Ly51^{med} (E) son significativamente menores desde 14.5F a 17.5F en los timos EphB2^{-/-} respecto de los valores EphB2LacZ. (F) Los valores de las células MHCII^{hi}Ly51^{med} son más altos en los timos EphB2^{-/-} respecto de los EphB2LacZ a 17.5F y 7PN. (G) No se observan diferencias significativas en la subpoblación MHCII^{hi}Ly51^{hi} entre los dos timos mutantes analizados. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.005 según el análisis estadístico de la t de Student.

La comparación de los valores observados en los mutantes EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} indicaban dos patrones de evolución bastante distintos dentro de las poblaciones definidas por Ly51 y MHCII. Los timos EphB2^{-/-} mostraron un porcentaje significativamente menor de células MHCII^{lo}Ly51^{lo} (**Fig. 86A**) a 15.5F pero no antes, cuando tanto los valores EphB2^{-/-} como los EphB3^{-/-} estaban significativamente más bajos que los WT (14.5F, **Fig. 82A**), donde después de haber incrementado los porcentajes, éstos bajan más lentamente en los timos EphB3^{-/-} explicando el resultado de la **Figura 86A**. Respecto de la subpoblación MHCII^{med}Ly51^{lo}, no había diferencias significativas entre ambos mutantes hasta 17.5F (**Fig. 86B**). La evolución de los dos mutantes era parecida pero, de nuevo, más lenta en los timos EphB3^{-/-}, lo que hacía que a 17.5F, las células EphB2^{-/-} se acercasen a valores WT mientras que las EphB3^{-/-} permanecían altas y de ahí las diferencias significativas entre los dos mutantes en ese estadio. Las diferencias más evidentes estaban en la población MHCII^{hi}Ly51^{lo} (**Fig. 86C**) que aumentaba significativamente en los timos EphB2^{-/-} a 15.5F y 17.5F para descender a 7PN. Aquí las células EphB3^{-/-}, por el contrario, iban aumentando gradualmente. Ya hemos señalado la posible heterogeneidad de esta población que explicaría el comportamiento distinto en los mutantes, pero no obstante, el fenotipo parece ligeramente más severo en ausencia de EphB3.

Cuando se analizaron las poblaciones más maduras Ly51⁺, las principales diferencias estaban en las subpoblaciones MHCII^{med}Ly51^{med} (**Fig. 86E**) y MHCII^{hi}Ly51^{med} (**Fig. 86F**), pero no en las subpoblaciones MHCII^{lo}Ly51^{med} y MHCII^{hi}Ly51^{hi} (**Fig. 86D, G** respectivamente). La subpoblación MHCII^{med}Ly51^{med} (**Fig. 86E**) incrementaba en los timos EphB2^{-/-} a 15.5F pero descendía a 17.5F. A 15.5F, las dos poblaciones iniciaban su recuperación pero ésta es más evidente en EphB2^{-/-}; luego, cuando comienza a descender a 17.5F, la caída es más drástica en EphB2^{-/-}, permaneciendo EphB3^{-/-} todavía alta. Sin embargo, al analizar la población más madura MHCII^{hi}Ly51^{med} (**Fig. 86F**), ésta aumentaba significativamente en los timos EphB2^{-/-} a 15.5F y 17.5F pero no a 7PN; en este caso, la población EphB2^{-/-} parecía comportarse curiosamente como la WT, mientras que la EphB3^{-/-} mantiene el retraso en su maduración haciendo que sus valores sean significativamente más bajos a 15.5F y 17.5F. No había diferencias significativas entre ninguno de los tres mutantes cuando se comparaban entre sí las presuntas poblaciones medulares MHCII^{med}Ly51⁻ y MHCII^{hi}Ly51⁻ (**Fig. 84**).

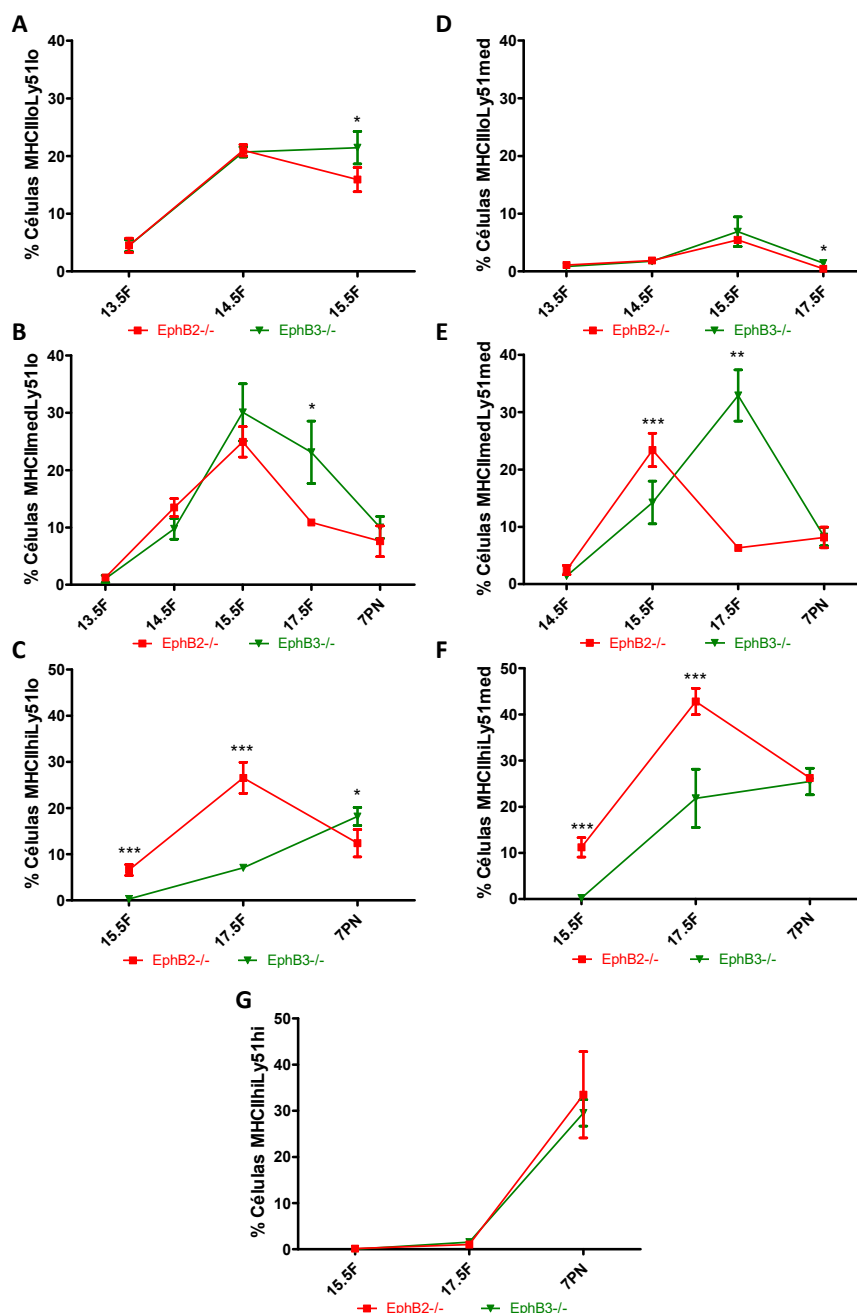


Figura 86. Análisis comparado de la evolución de las subpoblaciones MHCII^{lo}Ly51^{lo}, MHCII^{med}Ly51^{lo}, MHCII^{hi}Ly51^{lo}, MHCII^{lo}Ly51^{med}, MHCII^{med}Ly51^{med}, MHCII^{hi}Ly51^{med} y MHCII^{hi}Ly51^{hi} entre timos EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} durante la ontogenia y a 7PN. **(A)** El porcentaje de células MHCII^{lo}Ly51^{lo} sólo es significativamente menor en los timos EphB2^{-/-} a 15.5F respecto a los EphB3^{-/-}. **(B)** La proporción de células MHCII^{med}Ly51^{lo} es menor en los timos EphB2^{-/-} entre 15.5F y 7PN, pero sólo significativamente a 17.5F comparado con los valores EphB3^{-/-}. **(C)** Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor de células MHCII^{hi}Ly51^{lo} con respecto a los EphB3^{-/-} a 15.5F y 17.5F, pero menos a 7PN. **(D)** Las células MHCII^{lo}Ly51^{med} sólo son significativamente menores en los timos EphB2^{-/-} a 17.5F respecto a los EphB3^{-/-}. **(E)** Los timos EphB2^{-/-} respecto de los EphB3^{-/-} tienen un porcentaje significativamente mayor de células MHCII^{med}Ly51^{med} a 15.5F, pero menor a 17.5F. **(F)** El porcentaje de células MHCII^{hi}Ly51^{med} es significativamente mayor a 15.5F y 17.5F en los timos EphB2^{-/-} respecto de los EphB3^{-/-}. **(G)** No se observan diferencias significativas en la subpoblación MHCII^{hi}Ly51^{hi} al comparar los valores de los dos mutantes. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

En general, estos resultados indicaban, como ya hemos descrito para otros parámetros analizados, que la recuperación de la señal *reverse* en los timos EphB2LacZ favorece una cierta mejora en la maduración de las células MHCII⁺Ly51⁺ con respecto a su ausencia en los timos EphB2^{-/-}. Además, a lo largo de la descripción de estos resultados ya hemos señalado que respecto a las poblaciones definidas por la expresión de Ly51 y MHCII, la falta de EphB2 o EphB3 resulta en procesos de maduración alterados, en los que era la falta de EphB3 la que cursaba con mayor retraso en la maduración epitelial, generando en algunas poblaciones celulares un fenotipo más severo; es cierto, no obstante, que estos dos marcadores identifican poblaciones intermedias cuyo compromiso con corteza y médula está por definir y hacen difícil interpretar concluyentemente los resultados obtenidos.

1.5.4. Poblaciones $\beta 5t^+$

Profundizando en el estudio de las células epiteliales corticales Ly51⁺, analizamos la expresión de la subunidad $\beta 5t$ del complejo del proteosoma que específicamente es expresada por las células epiteliales corticales (*Murata y cols., 2007*) y que juega un papel fundamental en la generación de un repertorio inmunocompetente de células T CD8⁺ restringidas al contexto de MHC de clase I (*Nitta y cols., 2010*). En nuestro estudio, determinamos la expresión de $\beta 5t$, sobre secciones histológicas de 12.5F y 13.5F o sobre suspensiones celulares de 13.5F, 15.5F y 17.5F, ya que como hemos visto en el apartado 1.3, durante este periodo se expandía el epitelio cortical. Aunque $\beta 5t$ se ha detectado a 12.5F, como ya había sido descrito (*Ripen y cols., 2011*), en nuestro caso no fuimos capaces de detectar su presencia en este estadio mediante citometría de flujo y a 13.5F la proporción de células epiteliales totales EpCAM⁺CD45⁻ que expresaban $\beta 5t$ era muy baja. En estos mismos estadios el inmunomarcaje de secciones histológicas sí detectaba expresión de $\beta 5t$. Es necesario mencionar, que a diferencia del resto de trabajos presentes en la literatura donde se determinaba la expresión de esta molécula, tanto por inmunomarcaje como por citometría de flujo, los anticuerpos anti- $\beta 5t$ empleados habían sido desarrollados por los propios grupos de investigación y no empleaban anticuerpos comerciales como en nuestro caso. Estos anticuerpos sólo habían sido utilizados por otros autores para citometría de flujo pero en timo adulto y no durante el periodo fetal (*Wong y cols., 2014*).

El análisis de las secciones histológicas inmunomarcadas en timos WT reveló que la expresión de $\beta 5t$ se extendía por todo el primordio tímico a 12.5F y a 13.5F (**Fig. 87**). La tinción más fuerte residía en las células centrales y disminuía en los límites de la sección. A 12.5F no observábamos expresión en el paratiroides en aquellas secciones que aún conservaban el mismo, sin embargo, en este estadio y a 13.5F observábamos marcaje en las células epiteliales del esófago (datos no mostrados). En ambos casos, la expresión de $\beta 5t$ se combinó con la de la keratina 8 (K8), típica del epitelio tímico cortical y no con la de la molécula Ly51, pues su expresión mediante inmunomarcaje no se detecta hasta estadios más avanzados del desarrollo. Al analizar la expresión de $\beta 5t$ en los timos mutantes en ambos estadios, observábamos un patrón de expresión similar al descrito en los timos WT, sin que existieran diferencias significativas entre ellos tal y como puso de manifiesto el posterior análisis cuantitativo sobre las secciones histológicas (**Fig. 88**).

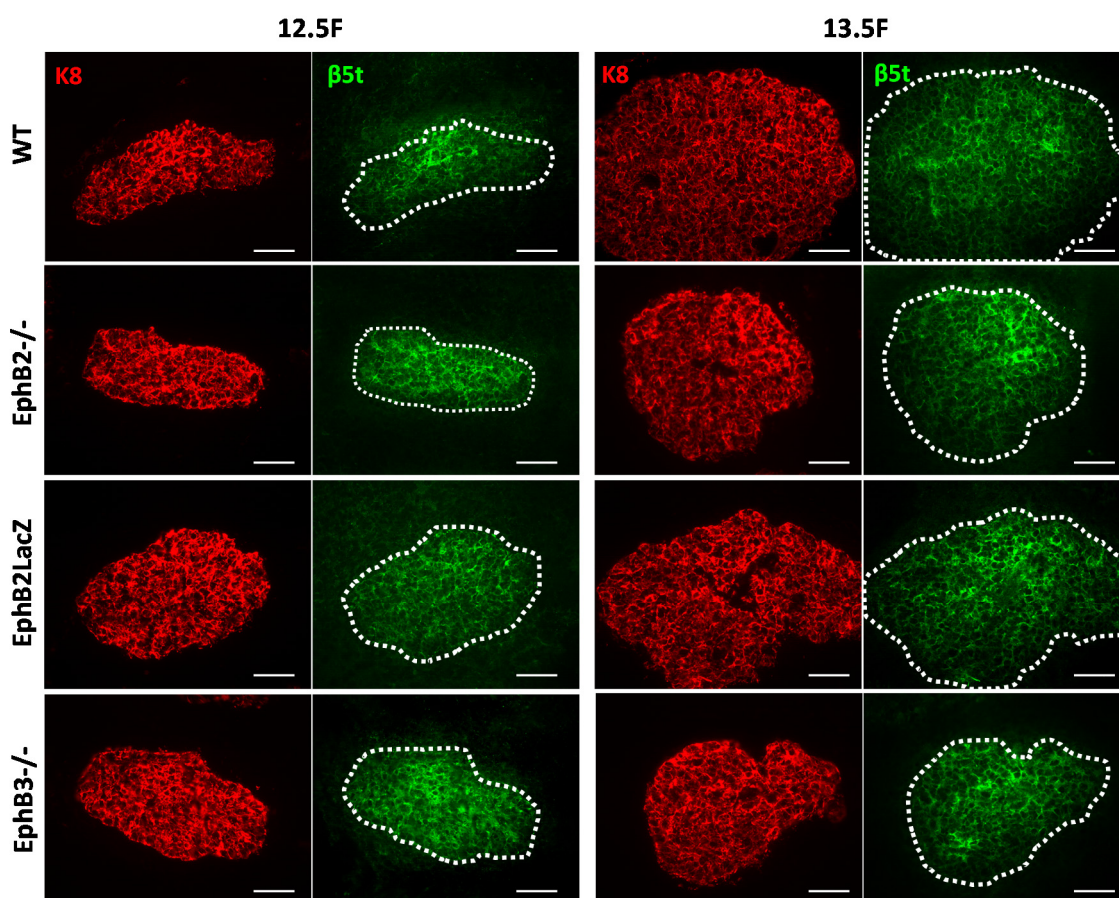


Figura 87. Expresión de $\beta 5t$ en el primordio tímico de 12.5F y 13.5F de ratones WT y deficientes en EphB. El primordio tímico fue identificado en base a la expresión de K8 (rojo). Las imágenes muestran como a 12.5F y a 13.5F la expresión de $\beta 5t$ (verde) se distribuye por todo el parénquima tímico (línea de puntos) tanto en animales WT como en deficientes para EphB, siendo más fuerte en la zona central. Escala: 50 μ m.

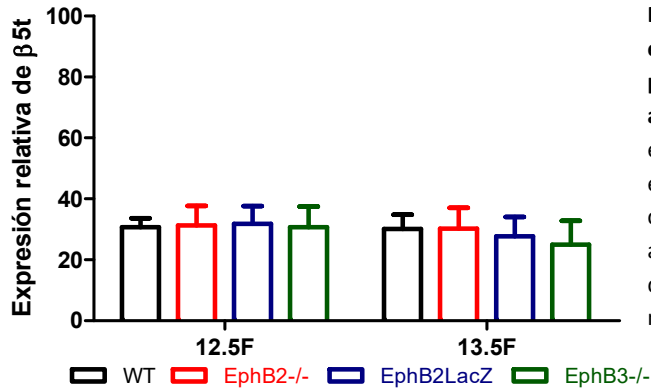


Figura 88. Análisis cuantitativo de la expresión de $\beta 5t$ respecto al tamaño del primordio tímico a 12.5F y 13.5F en animales WT y mutantes en EphB. La expresión de $\beta 5t$ se mantiene constante, entre 12.5F y 13.5F, tanto en la condición WT como en los mutantes, no observándose además diferencias entre los mismos. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 4 fetos analizados para cada estadio.

Tal y como se muestra en la **Figura 89**, determinamos la expresión de $\beta 5t$ mediante citometría de flujo siguiendo el esquema mostrado, analizándola en la población epitelial total ($\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$) y en las células Ly51^+ y Ly51^- . A 13.5F en los timos WT, como hemos indicado previamente, la proporción de células epiteliales totales $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$ que expresaban esta molécula era muy baja (2%), incrementando considerablemente a 15.5F (51%) y a 17.5F (71%) (**Fig. 90**).

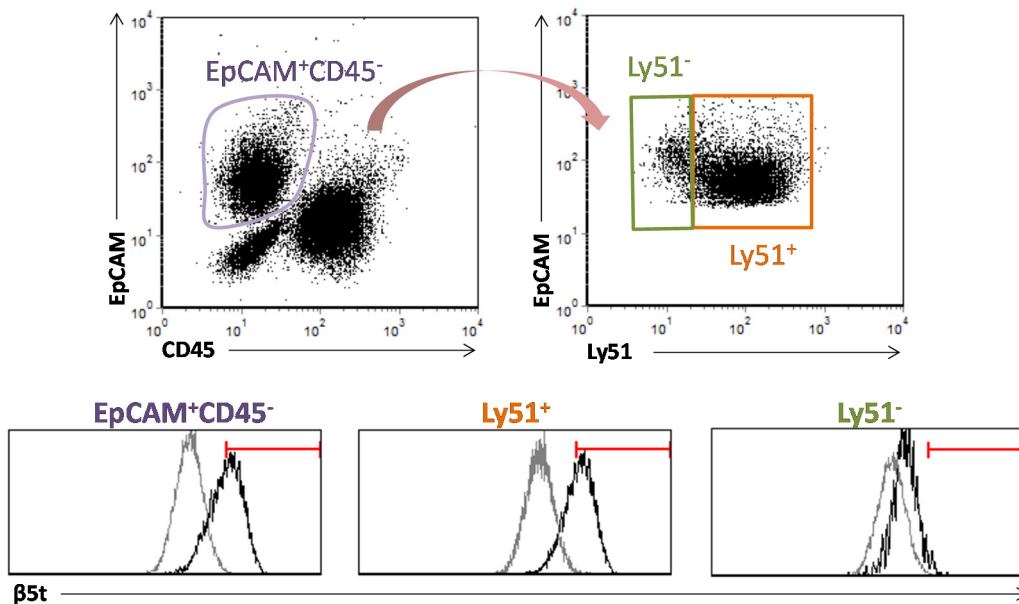


Figura 89. Identificación de la población epitelial total y de las subpoblaciones Ly51^- y Ly51^+ estudiadas en la valoración del marcador funcional $\beta 5t$. Se delimitó la población epitelial total $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$, a partir de la cual se identificaron las poblaciones Ly51^- y Ly51^+ . Además, en cada una de ellas se analizó la expresión de $\beta 5t$ (negro), en comparación con un control negativo basado en la no expresión de esta molécula en las células CD45^+ (gris). Los *dot plots* e histogramas son un ejemplo representativo de los valores analizados a 15.5F.

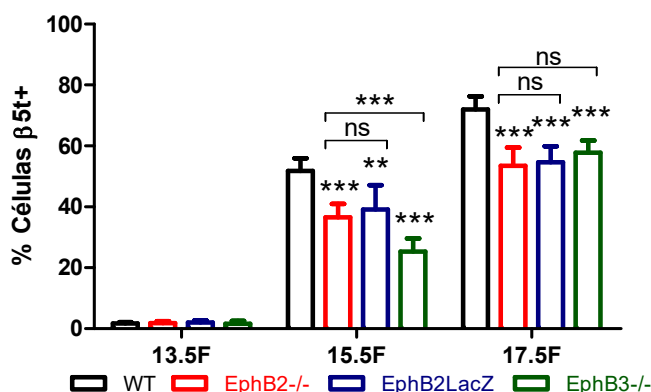


Figura 90. Proporción de células $\beta 5t^+$ en las células $EpCAM^+CD45^-$ en los timos WT y deficientes en EphB a 13.5F, 15.5F y 17.5F. La gráfica muestra como el porcentaje de células $\beta 5t^+$ aumenta entre 13.5F y 17.5F tanto en timos WT como en aquellos deficientes en EphB. Sin embargo, los timos mutantes tienen significativamente un menor porcentaje de estas células respecto a los WT tanto a 15.5F como a 17.5F. Sólo a 15.5F los timos EphB3-/- presentan un porcentaje significativamente menor que los timos EphB2-/. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$, según el análisis estadístico de la t de Student.

Por otro lado, combinamos la expresión de $\beta 5t$ junto con la del marcador Ly51, para estudiar la proporción de células $\beta 5t^+$ dentro de la población Ly51⁺, pero también dentro de la Ly51⁻, aparentemente comprometida con el linaje medular y por tanto, *a priori*, negativa para la expresión de esta molécula (**Fig. 89**). Nuestros resultados demostraban que a 13.5F la expresión de $\beta 5t$ en las células Ly51⁺ WT era muy baja (4%) (**Fig. 91A**), pero este porcentaje era aún menor en la población Ly51⁻ WT (1%) (**Fig. 91B**), mientras que a 15.5F la expresión de $\beta 5t$ aumentaba considerablemente en las células Ly51⁺ WT (**Fig. 91A**) pero continuaba siendo prácticamente nula en la población Ly51⁻ (**Fig. 91B**). Por último, a 17.5F la expresión de $\beta 5t$ aumentó de nuevo en las células corticales, pero además también en las células Ly51⁻ con respecto a 15.5F (**Fig. 91**).

Cuando analizábamos la expresión de este marcador en los timos mutantes, observábamos que la expresión de $\beta 5t$ en las células epiteliales totales sucedía de igual forma a la descrita en los timos WT. Sin embargo, en todos ellos hubo una reducción significativa en la expresión de esta molécula a 15.5F y 17.5F pero no a 13.5F (**Fig. 90**). Este comportamiento ocurría también dentro de la población Ly51⁺ (**Fig. 91A**) donde de nuevo, los timos EphB3-/- mostraban un fenotipo más severo que los EphB2-/-, aunque los tres mutantes mostraban porcentajes de células $\beta 5t^+$ significativamente muy por debajo de los WT; algo que también sucedía a 17.5F, aunque entonces no había diferencias entre los mutantes (**Fig. 91A**). En el caso de la población Ly51⁻, las

células $\beta 5t^+$ dentro de ella aumentaban respecto a los valores WT tanto en timos EphB2^{-/-} como EphB3^{-/-} a 15.5F, pero no en EphB2LacZ, con valores significativamente más altos en los primeros (**Fig. 91B**). A 17.5F el aumento del porcentaje de células Ly51⁺ $\beta 5t^+$ en los timos WT hacía que las poblaciones mutantes fueran significativamente más bajas, salvo en el caso de timos EphB2^{-/-}, y de nuevo, con valores particularmente bajos en EphB3^{-/-}.

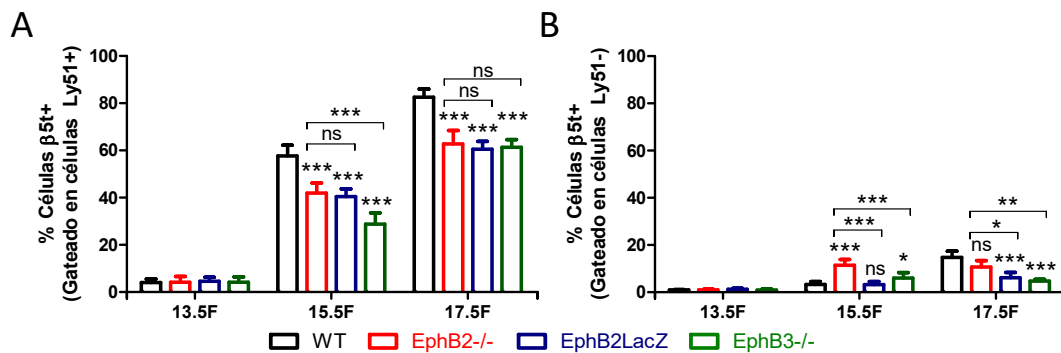


Figura 91. Proporción de células $\beta 5t^+$ en las poblaciones epiteliales Ly51⁺ y Ly51⁻ en los timos WT y deficientes en EphB a 13.5F, 15.5F y 17.5F. (A) La gráfica muestra como el porcentaje de células $\beta 5t^+$ en la población epitelial Ly51⁺ aumenta entre 13.5F y 17.5F tanto en timos WT como deficientes en EphB. Sin embargo, los timos mutantes tienen un porcentaje significativamente menor de estas células que los WT a 15.5F y 17.5F y a 15.5F los timos EphB3^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor que los EphB2^{-/-}. (B) La gráfica muestra como el porcentaje de células $\beta 5t^+$ en la población epitelial Ly51⁻ es prácticamente nula a 13.5F y 15.5F, aumentando ligeramente a 17.5F en los timos WT. En los mutantes, el porcentaje de estas células también aumenta muy ligeramente o se mantiene prácticamente inalterado, siendo significativamente mayor en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} a 15.5F, y significativamente menor en EphB2LacZ y EphB3^{-/-} respecto a los WT. Además, los timos EphB2^{-/-} presentan valores significativamente mayores respecto a EphB2LacZ y EphB3^{-/-} en ambos estadios. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

1.6. Evolución del epitelio medular

1.6.1. Poblaciones definidas por la expresión de UEA1 y MHCII

Al igual que en el caso de las poblaciones corticales, una vez analizada la evolución de las TEC corticales y medulares utilizando la expresión de Ly51 y UEA1, estudiamos la aparición de marcadores funcionales ahora asociados al epitelio medular, analizando la expresión de los marcadores MHCII y CD80 en el caso de la médula, dos moléculas que intervienen en la selección negativa de las células T y en la maduración del propio epitelio medular (Manley y cols., 2011).

Debido a los bajos niveles de expresión de MHCII observados a 12.5F en combinación con Ly51 y al escaso número de células UEA1⁺ existentes en ese estadio, nuestro estudio comenzó a 13.5F. Tal y como hemos visto en el apartado anterior, la expresión de MHCII estaba regulada temporalmente encontrándose células negativas (-), *low* (lo), *medium* (med) y *high* (hi), que en combinación con la expresión de UEA1 permitía definir la aparición y evolución de diferentes subpoblaciones (Fig. 92, 93).

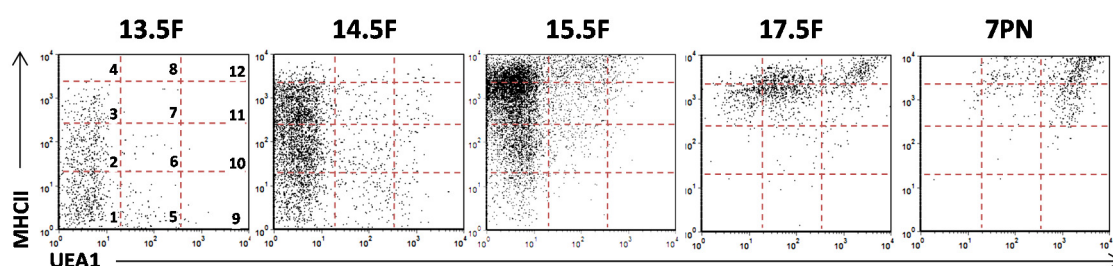


Figura 92. Evolución de las diferentes subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores MHCII y UEA1 durante el desarrollo embrionario (13.5F-17.5F) y 7PN en timos WT. Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales dentro de la población EpCAM⁺CD45⁻ en los timos WT según la expresión del marcador funcional MHCII y el medular UEA1. Tal y como muestran los *dot plots* a lo largo del desarrollo se definen las siguientes subpoblaciones: 1=MHCII⁻UEA1⁻; 2=MHCII^{lo}UEA1⁻; 3=MHCII^{med}UEA1⁻; 4=MHCII^{hi}UEA1⁻; 5=MHCII⁻UEA1^{lo/med}; 6=MHCII^{lo}UEA1^{lo/med}; 7=MHCII^{med}UEA1^{lo/med}; 8=MHCII^{hi}UEA1^{lo/med}; 9=MHCII⁻UEA1^{hi}; 10=MHCII^{lo}UEA1^{hi}; 11=MHCII^{med}UEA1^{hi} y 12=MHCII^{hi}UEA1^{hi}. Nótese el aumento de expresión inicialmente de la molécula MHCII y a partir de 15.5F el de UEA1. Los *dot plots* son representativos de un feto analizado para cada estadio.

A 13.5F (Fig. 92), la expresión de MHCII en los timos WT aparecía en las células UEA1⁻, siendo la población mayoritaria MHCII⁻UEA1⁻, aunque también había células MHCII^{lo}UEA1⁻ y MHCII^{med}UEA1⁻ (Fig. 93A) y algunas células MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} (Fig. 92). Entre 14.5F y 15.5F incrementaban considerablemente las células MHCII^{med}UEA1⁻ y las MHCII^{hi}UEA1⁻ (Fig. 93A). Notablemente, la expresión de MHCII aumentaba muy rápidamente en estos estadios, algo que ya habíamos observado en el caso de las células Ly51⁺ (ver Fig. 77). Ambas poblaciones, esta última menos numerosa, descendían a 15.5F desapareciendo a 7PN; todo ello en detrimento de la población doble negativa que era prácticamente inexistente a 15.5F (Fig. 93A). Además, aparecían, en este estadio, en muy baja proporción células MHCII^{lo,med,hi} que expresaban UEA1^{lo/med} (Fig. 93B). Entre 15.5F y 17.5F la proporción de células UEA1^{lo/med} (MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} y MHCII^{med}UEA1^{lo/med}) incrementaba (Fig. 93B) en detrimento de las poblaciones UEA1⁻ (Fig. 93A) y comenzaban a aparecer, además, células UEA1^{hi} (MHCII^{hi}UEA1^{hi} y MHCII^{med}UEA1^{hi}) (Fig. 93C), poblaciones que aumentaban a 7PN (Fig. 93C), disminuyendo aquellas que expresaban niveles bajos y

medios de UEA1, pero que seguían presentes en este estadio (**Fig. 93B**). Así, a 7PN existían cuatro poblaciones epiteliales principales: dos mayoritarias, la principal $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{hi}}$ y en menor medida aquellas que incluyen células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{UEA1}^{\text{hi}}$, y dos minoritarias proporcionalmente similares, $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$ y $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$ (**Fig. 92 y Fig. 93B, C**).

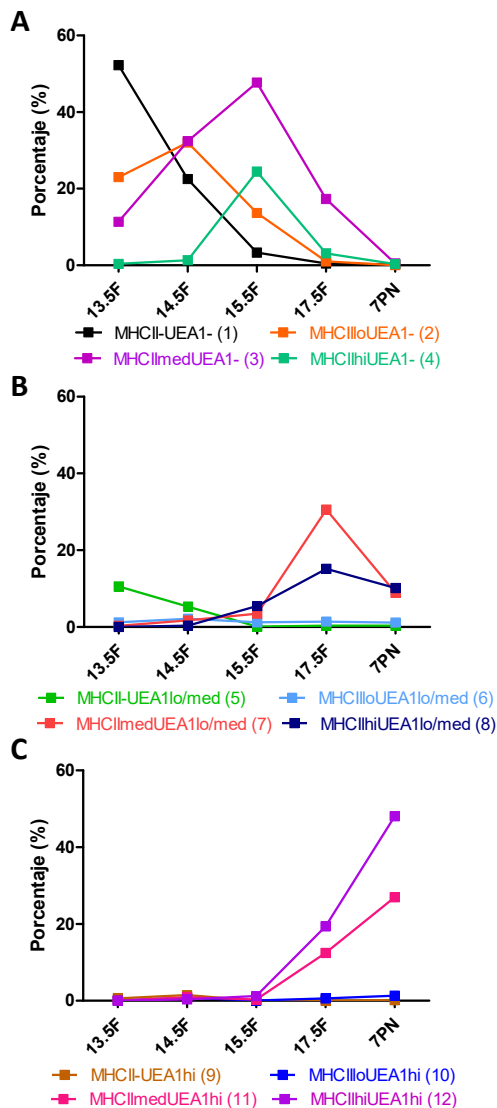


Figura 93. Evolución de las distintas subpoblaciones epiteliales definidas por la expresión de MHCII y UEA1 en timos WT durante el desarrollo embrionario (13.5F-17.5F) y a 7PN. Las gráficas muestran la expresión MHCII en las distintas subpoblaciones UEA1: UEA1^{lo} (**A**), $\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$ (**B**) y UEA1^{hi} (**C**). (**A**) Tal y como se observa en la figura la subpoblación mayoritaria a 13.5F corresponde a la población $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{lo}}$ que disminuye bruscamente a lo largo del desarrollo, pero también existen en menor proporción células $\text{MHCII}^{\text{lo}}\text{UEA1}^{\text{lo}}$ y $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{UEA1}^{\text{lo}}$. La primera de ellas aumenta ligeramente entre 13.5F y 14.5F, mientras que la segunda lo hace hasta 15.5F. Entre 14.5F y 15.5F también aparece la subpoblación $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{lo}}$. Todas estas subpoblaciones que no expresan UEA1 desaparecen a 7PN. (**B**) A partir de 15.5F aparecen células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$ y $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{lo/med}}$ que disminuyen a 7PN, de forma más notoria la primera, y células $\text{MHCII}^{\text{med}}\text{UEA1}^{\text{hi}}$ y $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{hi}}$ (**C**) que incrementan hasta 7PN constituyendo las subpoblaciones mayoritarias en ese estadio.

Al analizar la cinética de aparición de estas subpoblaciones en los timos mutantes (**Fig. 94**), observamos que todos ellos presentaban una acumulación estadísticamente significativa de células primitivas $\text{MHCII}^{\text{hi}}\text{UEA1}^{\text{lo}}$ (**Fig. 95**), que no expresaban ninguno de los dos marcadores, desde 13.5F hasta 15.5F, lo que confirmaba una vez más el retraso

en la adquisición del marcador MHCII, como vimos en el estudio de su evolución en las células corticales Ly51⁺ (ver Fig. 82, 83).

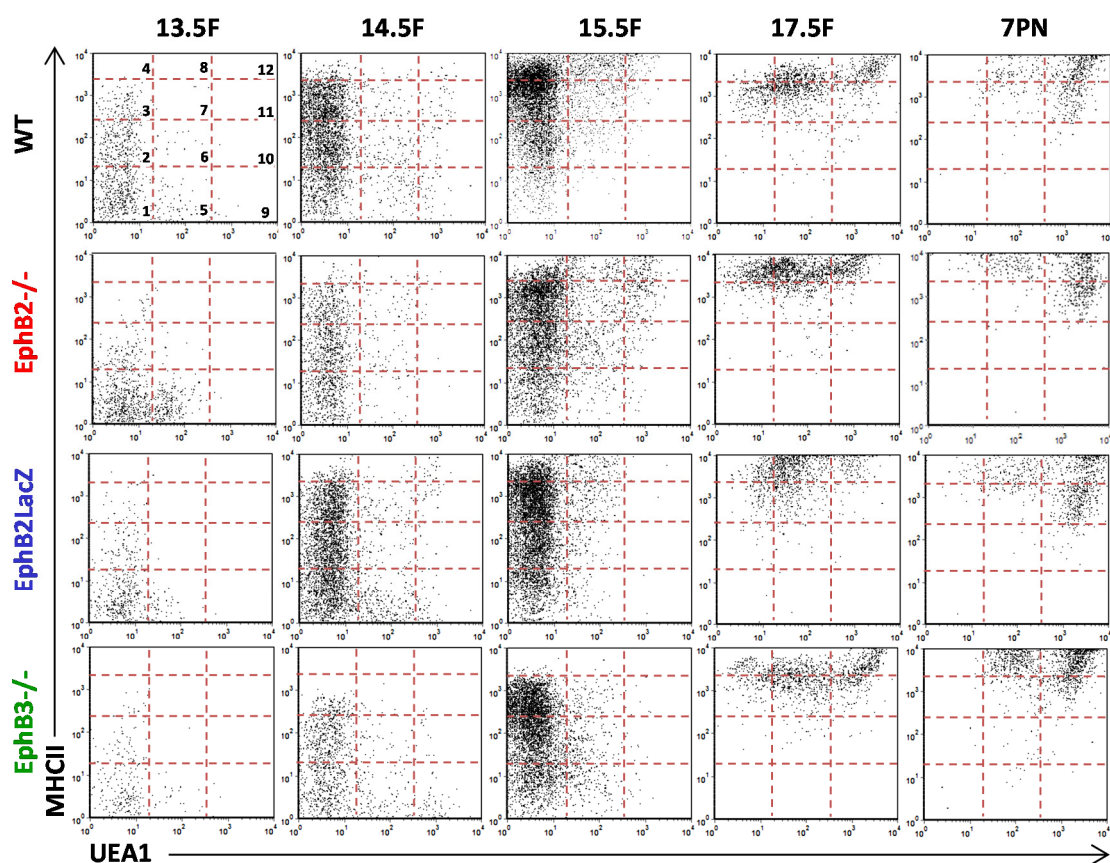


Figura 94. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores MHCII y UEA1 durante el desarrollo embrionario (13.5F-17.5F) y a 7PN en timos WT y deficientes en EphB. Se analizó la aparición y evolución de distintas subpoblaciones epiteliales dentro de la población EpCAM⁺CD45⁺ en los timos EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} en comparación con los WT, según el nivel de expresión del marcador funcional MHCII y el medular UEA1. Tal y como muestran los *dot plots* a lo largo del desarrollo en los timos mutantes se definen las mismas subpoblaciones que en los WT: 1=MHCII⁺UEA1⁻; 2=MHCII^{lo}UEA1⁻; 3=MHCII^{med}UEA1⁻; 4=MHCII^{hi}UEA1⁻; 5=MHCII⁺UEA1^{lo/med}; 6=MHCII^{lo}UEA1^{lo/med}; 7=MHCII^{med}UEA1^{lo/med}; 8=MHCII^{hi}UEA1^{lo/med}; 9=MHCII⁺UEA1^{hi}; 10=MHCII^{lo}UEA1^{hi}; 11=MHCII^{med}UEA1^{hi} y 12=MHCII^{hi}UEA1^{hi} y su patrón de diferenciación es similar al observado en la condición WT, aunque no igual. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados para cada estadio.

El retraso en la expresión de MHCII en la población MHCII⁺UEA1⁻ mutante correlacionaba con una reducción significativa en la proporción de células MHCII^{lo}UEA1⁻ (Fig. 96A) y de células MHCII^{med}UEA1⁻ (Fig. 96B) hasta 14.5F.

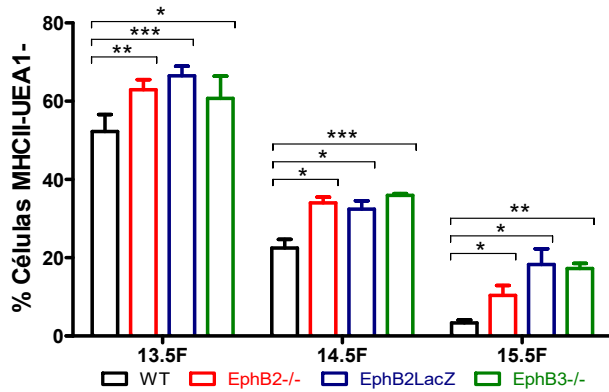


Figura 95. Evolución de la subpoblación epitelial MHCII^{lo}UEA1⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 13.5F y 15.5F. La gráfica muestra la evolución de la subpoblación MHCII^{lo}UEA1⁻ en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. En los timos WT la población MHCII^{lo}UEA1⁻ disminuye gradualmente desde 13.5F hasta 15.5F. Sin embargo, aunque en los mutantes el comportamiento es similar al de los WT, desde 13.5F existe una acumulación significativa de estas células en todos ellos respecto a los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

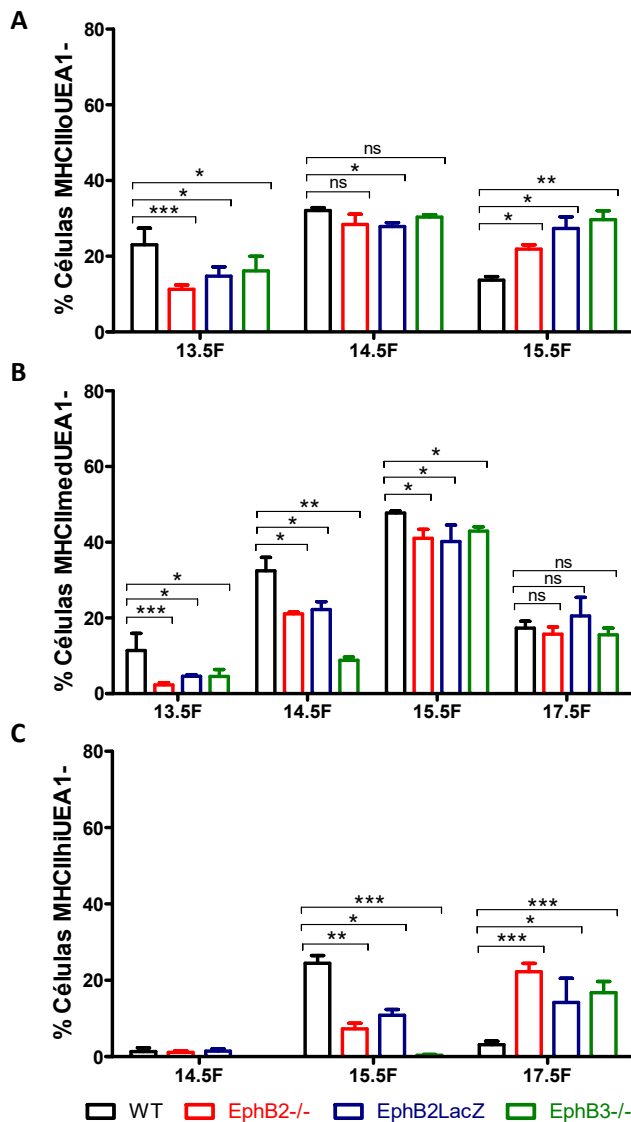


Figura 96. Evolución de las subpoblaciones MHCII^{lo}UEA1⁻ entre 13.5F y 15.5F, MHCII^{med}UEA1⁻ entre 13.5F y 17.5F y MHCII^{hi}UEA1⁻ entre 14.5F y 17.5F en timos WT y deficientes en EphB. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones MHCII^{lo}UEA1⁻ (A), MHCII^{med}UEA1⁻ (B) y MHCII^{hi}UEA1⁻ (C) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (A) La proporción de células MHCII^{lo}UEA1⁻ en los timos WT aumenta entre 13.5F y 14.5F y disminuye a 15.5F. Los mutantes siguen un patrón similar al WT entre 13.5F y 14.5F pero no a 15.5F, mostrando una reducción de esta población a 13.5F y 14.5F, pero de forma significativa en el primer estadio. Este retraso correlaciona con un incremento significativo de esta población en todos a 15.5F respecto a los valores WT. (B) En los timos WT la proporción de células MHCII^{med}UEA1⁻ aumenta entre 13.5F y 15.5F, y disminuye a partir de ese estadio. Las células mutantes siguen un patrón similar, aunque presentan valores significativamente menores en todos los estadios, excepto a 17.5F. (C) Las células MHCII^{hi}UEA1⁻ WT aumentan entre 14.5F-15.5F y descienden a 17.5F; sin embargo, en los timos mutantes la población aumenta gradualmente entre 14.5F y 17.5F correlacionando con descensos e incrementos significativos respecto a los valores WT a 15.5F y 17.5F respectivamente. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

A partir de 15.5F, todos los timos mutantes mostraron una acumulación de células $\text{MHCII}^{\text{UEA1}^-}$ (**Fig. 95**) y $\text{MHCII}^{\text{loUEA1}^-}$ (**Fig. 96A**) que correlacionaba con una reducción de células $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^-}$ (**Fig. 96B**) y también de las $\text{MHCII}^{\text{hiUEA1}^-}$ (**Fig. 96C**) en este estadio. Sin embargo, a 17.5F, esta última subpoblación se acumulaba en los mutantes, como consecuencia del retraso en la maduración de estas células que tardaban más en desaparecer que las WT y, por tanto, en regular positivamente la expresión de UEA1 (**Fig. 96C**).

Como hemos visto en el timo WT (**Fig. 93**), entre 15.5F y 17.5F aparecían mayoritariamente las células medulares $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^{\text{lo/med}}}$ y $\text{MHCII}^{\text{hiUEA1}^{\text{lo/med}}}$, y en menor proporción, las células $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^{\text{hi}}}$ y $\text{MHCII}^{\text{hiUEA1}^{\text{hi}}}$, que a 7PN constituían las poblaciones principales. Cuando analizábamos la aparición de estas subpoblaciones en los timos mutantes, las principales diferencias aparecían a 17.5F, cuando la médula empieza a expandirse. En este estadio, la población $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^{\text{lo/med}}}$ disminuía significativamente en los tres mutantes analizados y algo similar ocurría a 7PN sólo en los timos $\text{EphB2}^{-/-}$, ya que los timos $\text{EphB3}^{-/-}$ presentaban valores semejantes a los WT y los EphB2LacZ valores significativamente superiores (**Fig. 97A**). Hay que indicar aquí, aunque luego volveremos sobre ello, que los efectos de la falta de EphB2 son más severos que los mostrados por estas poblaciones medulares por la ausencia de EphB3. Presumiblemente, las células $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^{\text{lo/med}}}$ pueden evolucionar a células $\text{MHCII}^{\text{hiUEA1}^{\text{lo/med}}}$ o a células $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^{\text{hi}}}$. La caída mostrada en los porcentajes de células $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^{\text{lo/med}}}$ mutantes a 17.5F correlacionaba con el aumento, principalmente en los timos $\text{EphB2}^{-/-}$, de las células $\text{MHCII}^{\text{hiUEA1}^{\text{lo/med}}}$ (**Fig. 97B**) y con la caída en ese mismo estadio de la población $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^{\text{hi}}}$ (**Fig. 98A**). Aquí los valores mutantes respecto a los WT están bajos, especialmente en los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ y EphB2LacZ pero no en los $\text{EphB3}^{-/-}$ (**Fig. 98A**). Esta última población, a su vez, debe permanecer como tal o madurar a células $\text{MHCII}^{\text{hiUEA1}^{\text{hi}}}$. Los bajos valores de ésta en los mutantes tanto a 17.5F como a 7PN (**Fig. 98B**) justificaría nuevamente el retraso en la maduración de estas poblaciones. Las células $\text{MHCII}^{\text{medUEA1}^{\text{hi}}}$ que no maduren se acumularían como tales a 7PN. En este caso, de nuevo, los timos $\text{EphB3}^{-/-}$ no muestran cambios y sus valores permanecen similares a los WT (**Fig. 98A**).

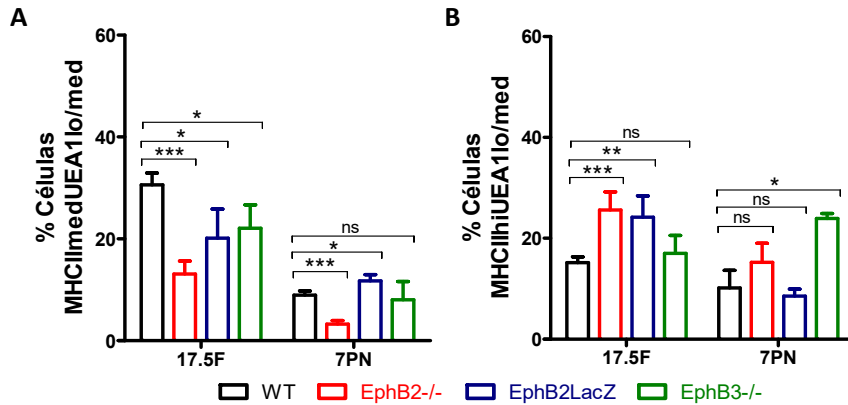


Figura 97. Evolución comparada de las subpoblaciones MHCII^{med}UEA1^{lo/med} y MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} a 17.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones MHCII^{med}UEA1^{lo/med} (A) y MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} (B) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (A) La proporción de células MHCII^{med}UEA1^{lo/med} de timos WT y mutantes disminuye entre 17.5F y 7PN; sin embargo, estos últimos sufren respecto a los WT un descenso significativo de esta población a 17.5F y también a 7PN pero únicamente en los timos EphB2^{-/-}. (B) Las células MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} WT y mutantes disminuyen entre 17.5F y 7PN excepto en los timos EphB3^{-/-}. El descenso de esta población en los EphB2^{-/-} y EphB2LacZ respecto a los valores WT es mayor debido al incremento significativo de estas células a 17.5F. A 7PN únicamente los EphB3^{-/-} tienen una acumulación significativa de estas células. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

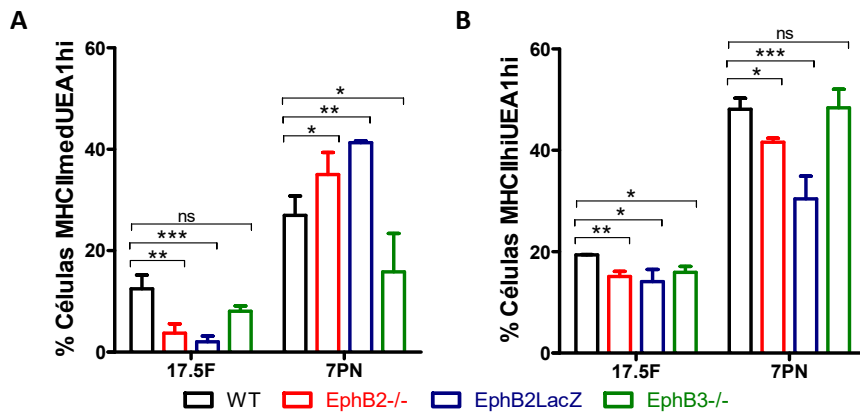


Figura 98. Evolución comparada de las subpoblaciones MHCII^{med}UEA1^{hi} y MHCII^{hi}UEA1^{hi} a 17.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. Las gráficas muestran la evolución de las subpoblaciones MHCII^{med}UEA1^{hi} (A) y MHCII^{hi}UEA1^{hi} (B) en los timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (A) La proporción de células MHCII^{med}UEA1^{hi} WT y mutantes aumenta entre 17.5F y 7PN, sin embargo, los mutantes presentan valores significativamente menores a 17.5F y mayores a 7PN. Los timos EphB3^{-/-} tenían valores más bajos de esta población a 17.5F y 7PN pero significativamente sólo a 7PN. (B) La proporción de células MHCII^{hi}UEA1^{hi} aumenta entre 17.5F y 7PN en los timos WT y en los mutantes, aunque estos últimos presentan valores significativamente menores a 17.5F y 7PN respecto a los WT, excepto los EphB3^{-/-} en este último estadio. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Efectivamente, como ya hemos apuntado, la falta de EphB no afectaba de la misma manera a las poblaciones medulares analizadas. Los valores de los timos EphB2LacZ mostraban menos diferencias o, en algunos casos ninguna, con respecto a los WT que los timos EphB2^{-/-}, y los efectos de la ausencia de EphB3 resultaban en menos alteraciones que los mostrados por los mutantes EphB2^{-/-}.

En todas las subpoblaciones que no expresaban UEA1, pero sí diferentes niveles de MHCII, no se observaban diferencias al comparar los valores de los timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (datos no mostrados). Sin embargo, cuando comparábamos aquellas poblaciones que ya expresaban UEA1 (UEA1^{lo/med} y UEA1^{hi}) a 17.5F y 7PN, pertenecientes al linaje medular, se apreciaban interesantes diferencias entre los distintos mutantes fundamentalmente entre EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}. Así, al analizar la población MHCII^{med}UEA1^{lo/med} (**Fig. 99A**) en los timos EphB2LacZ, éstos presentaban valores mayores que los timos EphB2^{-/-} a 17.5F y 7PN, siendo solamente significativo en este último estadio; mientras que la población MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} (**Fig. 99B**) era igual a 17.5F y ligeramente inferior a 7PN en los timos EphB2LacZ respecto de los EphB2^{-/-}. Por otro lado, los timos EphB3^{-/-} mostraron un porcentaje mayor de la población MHCII^{med}UEA1^{lo/med} (**Fig. 99C**) a 17.5F y 7PN respecto a los timos EphB2^{-/-} aunque sólo era significativo en el primer estadio; mientras que la población MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} (**Fig. 99D**) era menor a 17.5F y mayor a 7PN pero sin ser estadísticamente significativo respecto a los timos EphB2^{-/-}.

Por último, no existieron diferencias significativas entre poblaciones EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ en los valores de las subpoblaciones MHCII^{med}UEA1^{hi} (**Fig. 100A**) y MHCII^{hi}UEA1^{hi} (**Fig. 100B**) a 17.5F y 7PN, pero sí entre EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. Así, la subpoblación MHCII^{med}UEA1^{hi} (**Fig. 100C**) era más alta en los timos EphB3^{-/-} a 17.5F, pero menor a 7PN; mientras que la MHCII^{hi}UEA1^{hi} (**Fig. 100D**) sólo incrementaba a 7PN respecto a los valores EphB2^{-/-}.

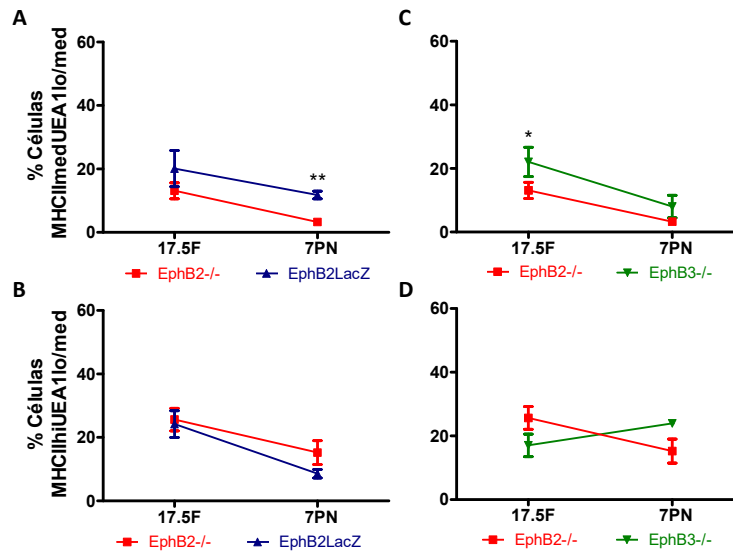


Figura 99. Análisis comparado de las subpoblaciones epiteliales MHCII^{med}UEA1^{lo/med} y MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} a 17.5F y 7PN entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. (A) Los timos EphB2^{-/-} respecto de los EphB2LacZ tienen un menor porcentaje de células MHCII^{med}UEA1^{lo/med} en ambos estadios, pero las diferencias sólo son significativas a 7PN. (B) La subpoblación MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} no muestra diferencias entre los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, aunque a 7PN estos últimos tienen un porcentaje ligeramente menor. (C) Los timos EphB2^{-/-} respecto a EphB3^{-/-} muestran una menor proporción de células MHCII^{med}UEA1^{lo/med} en ambos estadios, pero significativamente sólo a 17.5F. (D) No existen diferencias en la subpoblación MHCII^{hi}UEA1^{lo/med} entre los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ según el análisis estadístico de la t de Student.

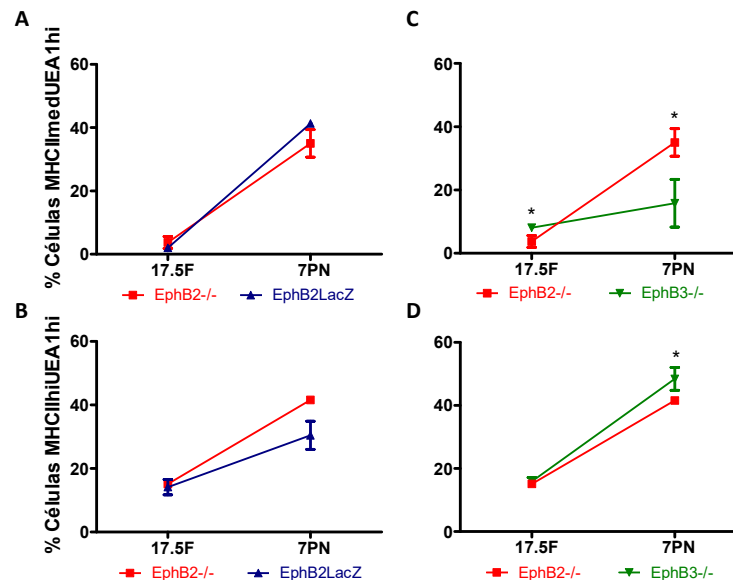


Figura 100. Análisis comparado de las subpoblaciones epiteliales MHCII^{med}UEA1^{hi} y MHCII^{hi}UEA1^{hi} a 17.5F y 7PN entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. (A) No existen diferencias significativas en las proporciones de la subpoblación MHCII^{med}UEA1^{hi} entre los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, ni tampoco en la subpoblación MHCII^{hi}UEA1^{hi} (B). (C) Los timos EphB2^{-/-} tienen respecto a los EphB3^{-/-} un porcentaje significativamente menor de células MHCII^{med}UEA1^{hi} a 17.5F pero mayor a 7PN. (D) Los timos EphB2^{-/-} presentan respecto a los timos EphB3^{-/-} un porcentaje significativamente menor de células MHCII^{hi}UEA1^{hi} a 7PN, pero no a 17.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Estos resultados indican que el patrón de maduración fenotípico y funcional de las células epiteliales medulares MHCII⁺UEA1⁺ de mutantes EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, aunque en términos generales son similares en cuanto que muestran un retraso respecto al observado en ratones WT, exhiben patrones de desarrollo diferentes y específicos entre los dos mutantes, especialmente en estadios avanzados, que sugieren una mayor relevancia de la falta de EphB2 que de la EphB3 a la hora de regular la maduración funcional de los progenitores del epitelio medular.

1.6.2. Poblaciones definidas por la expresión de CD40 y CD80

Continuando con el análisis fenotípico de las distintas poblaciones de TECs corticales y medulares, incorporamos nuevos marcadores implicados en la función medular, estudiando la aparición y evolución de las células epiteliales que expresaban las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD80. Como ya hemos dicho, CD40 se expresa en el epitelio cortical, pero también permite definir células epiteliales medulares (*Shakib y cols., 2009*) y la segunda molécula es específica de las células epiteliales medulares maduras en el timo fetal tardío y postnatal (*Gabler y cols., 2007*). A lo largo del desarrollo, la aparición de las células medulares maduras CD80⁺ se produce exclusivamente en células que son CD40^{med/hi} y no expresan marcadores corticales (*Ribeiro y cols., 2013*).

Consiguientemente, analizamos la presencia de células epiteliales CD40^{med/hi}CD80⁺ gateadas en la población EpCAM⁺CD45⁻ en timos WT y, posteriormente, en los timos deficientes en EphB para ver si existían diferencias entre ambos. Nuestro estudio se realizó a 17.5F y 7 días de desarrollo postnatal (7PN) porque, como antes indicábamos, a partir de 17.5F comenzaban a evidenciarse las diferencias en el desarrollo del epitelio medular en los timos deficientes en EphB y porque otros autores han descrito que la expresión de CD80 no se detecta, o es muy baja antes de 16.5F-17.5F (*Gabler y cols., 2007; Ribeiro y cols., 2013*).

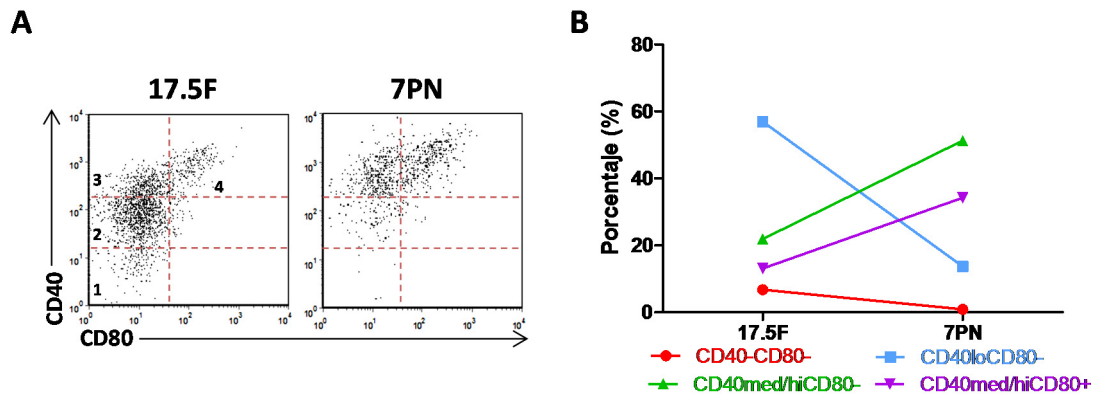


Figura 101. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores CD40 y CD80 a 17.5F y 7PN en timos WT. (A) Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales dentro de la población EpCAM⁺CD45⁻ en los timos WT según el nivel de expresión de los marcadores funcionales CD40 y CD80. Tal y como muestran los *dot plots* a 17.5F y 7PN pueden definirse cuatro subpoblaciones: 1=CD40⁻CD80⁻; 2=CD40^{lo}CD80⁻; 3= CD40^{med/hi}CD80⁻ y 4= CD40^{med/hi}CD80⁺. A 17.5F la población mayoritaria corresponde a las células CD40^{lo}CD80⁻, pero existe también una baja proporción de células CD40^{med/hi}CD80⁻ y CD40^{med/hi}CD80⁺ que, sin embargo, son las subpoblaciones mayoritarias a 7PN. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados para cada estadio. **(B)** La gráfica muestra la evolución de las distintas subpoblaciones anteriormente descritas entre 17.5F y 7PN en los timos WT. Nótese la disminución de las subpoblaciones CD40⁻CD80⁻ y CD40^{lo}CD80⁻ entre ambos estadios y el aumento del porcentaje de células CD40^{med/hi}CD80⁻ y CD40^{med/hi}CD80⁺.

A 17.5F en el timo WT se podían definir las tres subpoblaciones CD40 (CD40⁻, CD40^{lo} y CD40^{med/hi}) antes mencionadas, pero sólo dos para CD80 que denominamos CD80⁻ y CD80⁺ (**Fig. 101A**). En este estadio, sólo la subpoblación CD40^{med/hi} expresaba CD80 en un bajo porcentaje (13%), siendo la población mayoritaria la CD40^{lo}CD80⁻ (57%) (**Fig. 101B**). Entre 17.5F y 7PN, aunque se mantenía una pequeña proporción de células CD40⁻CD80⁻ y otra mayor, CD40^{lo}CD80⁻, ambas descendían drásticamente a 7PN (**Fig. 101B**), y la mayoría estaba en las dos subpoblaciones que aumentaban con respecto a 17.5F, la CD40^{med/hi}CD80⁻ (51%) y la CD40^{med/hi}CD80⁺ (34%) (**Fig. 101B**). Aparentemente, por tanto, las células CD40^{med/hi}CD80⁺ derivaban de células CD40^{med/hi}CD80⁻ que regulan positivamente la expresión de CD80.

Si bien el patrón de aparición/evolución de las subpoblaciones CD40/CD80 en los timos mutantes (**Fig. 102**) era similar al de los WT, había algunas diferencias. A 17.5F éstas ocurrían en la proporción de células maduras CD40^{med/hi}CD80⁺, que era significativamente menor en todos los mutantes analizados y, particularmente en EphB2^{-/-} (**Fig. 103A**). Esta reducción no se correspondía con un incremento de la

población $CD40^{med/hi}CD80^-$ (**Fig. 103B**), sino de las subpoblaciones que la precedían ($CD40^-CD80^-$ y $CD40^{lo}CD80^-$), donde nuevamente los cambios eran más severos en los timos $EphB2^{-/-}$. Así, en éstos había un incremento significativo de la subpoblación $CD40^-CD80^-$ (**Fig. 103C**) y de los porcentajes de $CD40^{lo}CD80^-$ (**Fig. 103D**) en $EphB2^{-/-}$ y $EphB2LacZ$. Estos resultados sugieren que la población $CD40^{med/hi}CD80^-$ constituía un compartimento intermedio desde el que muchas células WT ya han pasado a células maduras $CD40^{med/hi}CD80^+$ y las mutantes apenas alcanzan el estadio $CD40^{med/hi}CD80^-$, lo que hace que no haya diferencias entre timos WT y mutantes. Estos datos sugieren que la regulación positiva de la expresión de CD80 es muy rápida y la población $CD40^{med/hi}CD80^-$ pasa rápido a $CD40^{med/hi}CD80^+$, o que hay poblaciones intermedias no consideradas en nuestro estudio.

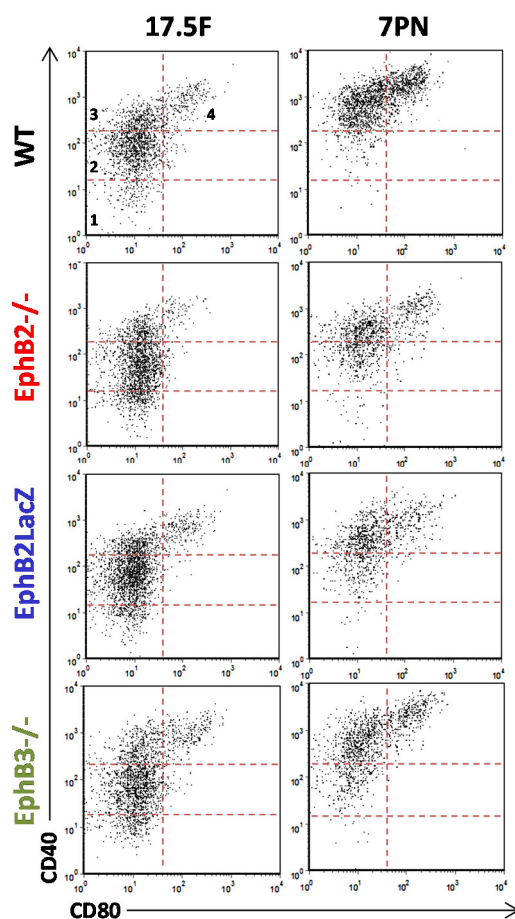


Figura 102. Evolución de las subpoblaciones epiteliales tímicas en base a la expresión de los marcadores CD40 y CD80 entre 17.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. Se analizó la aparición de distintas subpoblaciones epiteliales $CD40/CD80$ dentro de la población $EpCAM^+CD45^-$ en los timos $EphB2^{-/-}$, $EphB2LacZ$ y $EphB3^{-/-}$ en comparación con los timos WT. Tal y como muestran los *dot plots* en los timos mutantes se describen las mismas subpoblaciones que en los WT (1= $CD40^-CD80^-$; 2= $CD40^{lo}CD80^-$; 3= $CD40^{med/hi}CD80^-$ y 4= $CD40^{med/hi}CD80^+$). Nótese como el patrón de diferenciación es bastante similar al observado en la condición WT. Los *dot plots* son representativos de los fetos analizados en cada estadio.

Cuando analizábamos estas subpoblaciones a 7PN observábamos más fehacientemente la reducción de la proporción de células maduras $CD40^{med/hi}CD80^{+}$ en todos los mutantes aunque menos evidente en los ratones $EphB3^{-/-}$ que en los $EphB2^{-/-}$ y los $EphB2LacZ$ (**Fig. 103A**). De nuevo el retraso observado en la aparición de esta subpoblación medular madura no correlacionaba con incrementos en la población $CD40^{med/hi}CD80^{-}$ (**Fig. 103B**), pero si en la $CD40^{lo}CD80^{-}$ (**Fig. 103D**), que aumentaba significativamente en todos los mutantes a excepción de en $EphB3^{-/-}$, donde el aumento no era significativo.

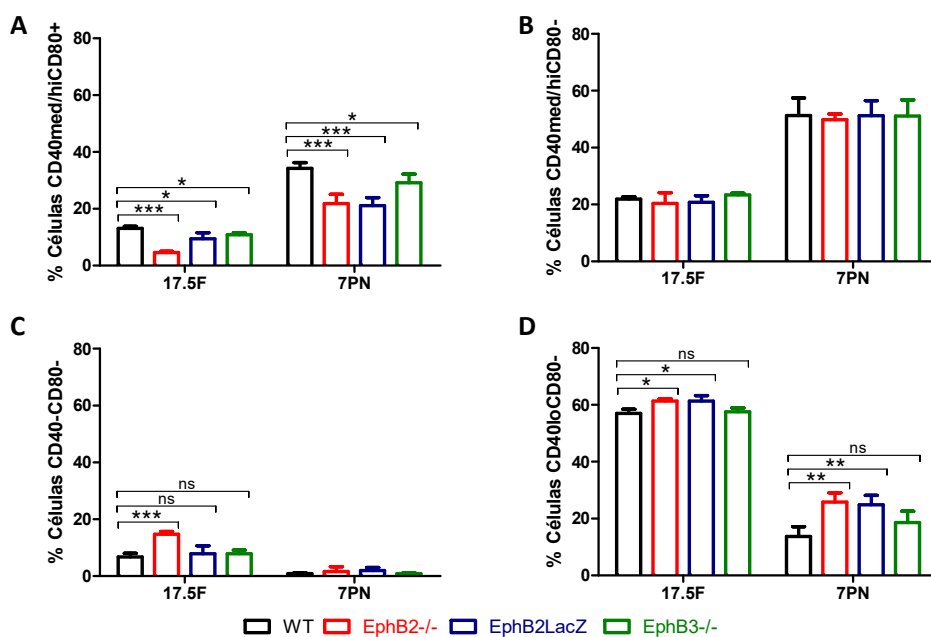


Figura 103. Evolución de las subpoblaciones $CD40^{med/hi}CD80^{+}$, $CD40^{med/hi}CD80^{-}$, $CD40^{-}CD80^{-}$ y $CD40^{lo}CD80^{-}$ en timos WT y deficientes en EphB entre 17.5F y 7PN. La gráfica muestra la evolución de las subpoblaciones $CD40^{med/hi}CD80^{+}$ (**A**), $CD40^{med/hi}CD80^{-}$ (**B**), $CD40^{-}CD80^{-}$ (**C**) y $CD40^{lo}CD80^{-}$ (**D**) en los timos WT, $EphB2^{-/-}$, $EphB2LacZ$ y $EphB3^{-/-}$. (**A**) En los timos WT y mutantes la proporción de células $CD40^{med/hi}CD80^{+}$ aumenta entre 17.5F y 7PN, con valores significativamente menores en los mutantes respecto a los WT. (**B**) La proporción de células $CD40^{med/hi}CD80^{-}$ aumenta entre 17.5F y 7PN en los timos WT y mutantes, sin que existan diferencias entre ellos. (**C**) La población $CD40^{-}CD80^{-}$ disminuye entre 17.5F y 7PN en los timos WT y mutantes, sólo los timos $EphB2^{-/-}$ mantienen valores significativamente más altos a 17.5F. (**D**) El porcentaje de células $CD40^{lo}CD80^{-}$ disminuye acusadamente en los timos WT y los mutantes entre 17.5F y 7PN, sin embargo, los timos $EphB2^{-/-}$ y $EphB2LacZ$, pero no $EphB3^{-/-}$, presentan valores significativamente mayores a 17.5F y 7PN respecto a los WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Estos resultados indicaban que los timos EphB3^{-/-} aunque mostraban un cierto retraso en la maduración de las mTEC CD40^{med/hi}CD80⁺ eran capaces de diferenciar mejor que los EphB2^{-/-} o EphB2LacZ. De hecho, cuando se comparaban las proporciones de las distintas subpoblaciones entre los mutantes, sólo observábamos diferencias en la población CD40^{med/hi}CD80⁺ cuyas proporciones eran significativamente más bajas en EphB2^{-/-} que en EphB2LacZ a 17.5F pero no a 7PN (**Fig. 104A**) y significativamente menores respecto a EphB3^{-/-} tanto a 17.5F como a 7PN (**Fig. 104B**).

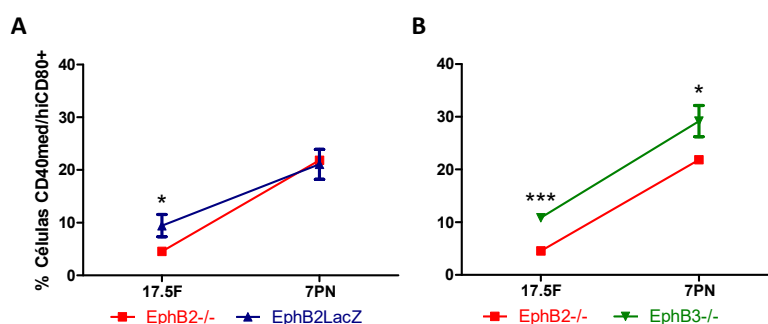


Figura 104. Análisis comparado de la subpoblación epitelial CD40^{med/hi}CD80⁺ a 17.5F y 7PN entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-}. (A) Los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente menor respecto de los timos EphB2LacZ de la subpoblación CD40^{med/hi}CD80⁺ a 17.5F, pero no a 7PN. **(B)** Los timos EphB2^{-/-} muestran menos células CD40^{med/hi}CD80⁺ en ambos estadios respecto a los timos EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

1.6.3. Poblaciones definidas por la expresión de AIRE

Dentro de esa misma idea de evaluar comparativamente las posibles alteraciones en la aparición y evolución de las poblaciones epiteliales medulares que expresan marcadores funcionales, estudiamos la expresión de AIRE, una molécula capital para el funcionamiento de la médula tímica. Para ello, realizamos un análisis cuantitativo sobre secciones histológicas donde determinamos el número de células AIRE⁺ en timos (17.5F) con una médula incipiente y en otros (7PN) con una médula mucho más desarrollada. En ambos casos, el número de células AIRE⁺ fue calculado con respecto al tamaño del área medular (en mm², AIRE⁺/mm²) identificada por la expresión de K5. Tal y como muestra la **Figura 105**, las células AIRE⁺ tanto a 17.5F como 7PN estaban

distribuidas por todo el área medular K5⁺ apareciendo en menor número a 17.5F. Este hecho se confirmó en el análisis cuantitativo (**Fig. 106**). Cuando se analizó la aparición y evolución de estas células en los timos mutantes observábamos que el patrón de distribución en el área K5⁺ era como el descrito en los timos WT, pero el estudio morfométrico demostraba diferencias. Así a 17.5F, los timos deficientes en EphB2 y EphB3 mostraban una reducción significativa del número relativo de células AIRE⁺ por mm² de médula. Sin embargo, en el caso de los timos EphB2LacZ no había diferencias respecto a los WT. Por otro lado, cuando calculábamos el número de células AIRE⁺ a 7PN aumentaba respecto a los

valores encontrados a 17.5F tanto en timos WT como mutantes, salvo en los EphB2LacZ que mostraban aproximadamente los mismos valores en ambos estadios (**Fig. 106**). En cualquier caso, el número de células AIRE⁺ por sección medular de los timos postnatales mutantes era significativamente menor que los WT, especialmente en el caso de los EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, porque no habían aumentado al mismo ritmo que los timos WT después del nacimiento.

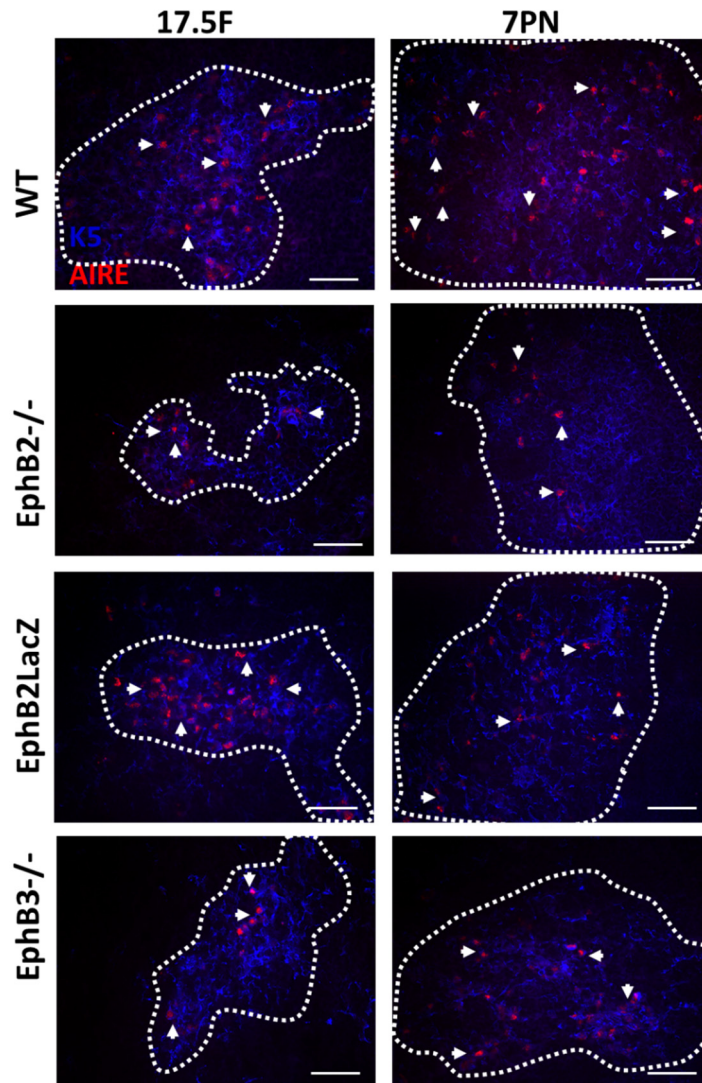


Figura 105. Estudio mediante microscopía de fluorescencia de la presencia de células AIRE⁺ en el timo de 17.5F y 7PN de ratones WT y deficientes en EphB. Las imágenes muestran como tanto en timos WT como en mutantes, la expresión de las células AIRE⁺ (rojo, flechas) estaba restringida a las áreas medulares K5⁺ (azul). En ambas condiciones entre ambos estadios había un incremento en la proporción de células AIRE⁺ así como una expansión de las áreas K5⁺. Sin embargo, los timos mutantes, tanto a 17.5F como a 7PN, mostraban un área medular K5⁺ más pequeña que los timos WT. Escala: 50µm

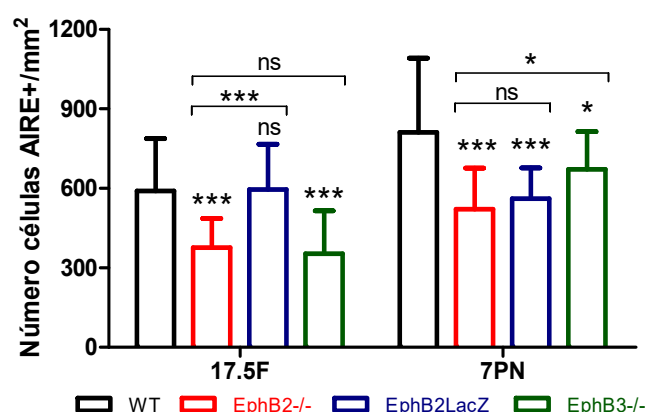


Figura 106. Número de células AIRE⁺/mm² en el área medular K5⁺ a 17.5F y 7PN en timos WT y deficientes en EphB. Un análisis cuantitativo sobre secciones histológicas muestra como el número de células AIRE⁺ con respecto al tamaño medular (K5⁺) aumenta en los timos WT entre 17.5F y 7PN. Este patrón ocurre también en el caso de los timos mutantes para EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} pero no en los EphB2LacZ, que muestran un número similar en ambos estadios. A 17.5F, los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} presentan una reducción significativa en el número de células AIRE⁺, pero no los EphB2LacZ. Sin embargo, a 7PN todos los timos mutantes tienen valores significativamente más bajos de células AIRE⁺ que los timos WT. Nótese como los timos EphB2^{-/-} tienen significativamente menos células AIRE⁺ que los EphB2LacZ a 17.5F y menos que EphB3^{-/-} a 7PN. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de 3 timos analizados y de, al menos, 7 secciones no solapantes estudiadas en cada una de ellos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

1.6.4. La expansión medular al final del periodo embrionario

Hacia el final del periodo fetal y en los primeros días de la vida postnatal los focos medulares que se distribuyen por el parénquima tímico se expanden constituyendo la médula central única rodeada de islotes más o menos conectados entre sí (Irla y cols., 2013). Porque junto con los cambios morfológicos en los procesos de las TECs (ver luego), la otra alteración morfológica más evidente descrita en los timos deficientes en EphB era la aparente desorganización de las áreas medulares que mostraban, en general, menor tamaño y aparecían dispersas por el parénquima tímico (García-Ceca y cols., 2009a), determinamos, si este fenotipo medular era consecuencia de la falta de señalización EphB, para lo cual analizamos si el tratamiento de lóbulos WT con anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 provocaba alteraciones en la histología de la médula tímica.

Dichos anticuerpos fueron testados para conocer si en nuestras condiciones experimentales bloqueaban la señalización vía EphB2 o EphB3, asemejándose a la condición de los ratones mutantes estudiados en este trabajo. A tal fin, analizamos mediante *Western Blot* el grado de fosforilación de residuos de tirosina específicos de

estos receptores en suspensiones celulares tímicas totales de 14.5F tras su incubación con los mismos. Como control positivo del grado de fosforilación en los residuos de tirosina de estos receptores, la suspensión celular tímica total fue estimulada de forma conjunta con las proteínas de fusión ephrina-B1Fc y ephrina-B2Fc tras clusterización de las mismas en placa (Ver Material y Métodos; Apartado 10.1).

Previamente a la determinación de los niveles de fosforilación de los residuos de tirosina específicos de cada receptor, analizamos el grado de tirosinas totales fosforiladas (pTyr) en el conjunto de los receptores Eph totales identificados como proteínas de aproximadamente 110 KDa. Tal y como se observa en la **Figura 107A**, tras el tratamiento de la suspensión celular durante 5 minutos con los anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 el nivel de tirosina total fosforilada en estos receptores disminuía al comparar los valores de fosforilación normalizados con los correspondientes controles de isotipo (valor 1). Los resultados confirmaron que estos anticuerpos reducían la fosforilación de los residuos de tirosina de las Eph y en consecuencia disminuían la señalización *forward* a través de los mismos. Sin embargo, la estimulación mediada con las proteínas de fusión ephrina-B1Fc y ephrina-B2Fc aumentaba las tirosinas fosforiladas con respecto a su correspondiente control Fc (**Fig. 107A**).

Para estudiar la fosforilación de residuos de tirosina específicamente en los receptores EphB2 y EphB3 utilizamos anticuerpos que reconocían dichos residuos fosforilados en las dos Eph. En el caso de EphB2, debido a la ausencia de anticuerpos comerciales capaces de identificar exclusivamente las tirosinas fosforiladas de EphB2, empleamos un anticuerpo que reconocía de forma conjunta la tirosina fosforilada de EphB1 y EphB2 (pTyr594 y pTyr604, respectivamente). Como se observa en la **Figura 107B**, el tratamiento con el anticuerpo anti-EphB2 disminuía de forma específica los niveles de tirosina fosforilada de EphB1+EphB2 con respecto al control isotópico, mientras que la estimulación con ephrina-B1Fc y ephrina-B2Fc nuevamente inducía el incremento en la fosforilación de estos residuos.

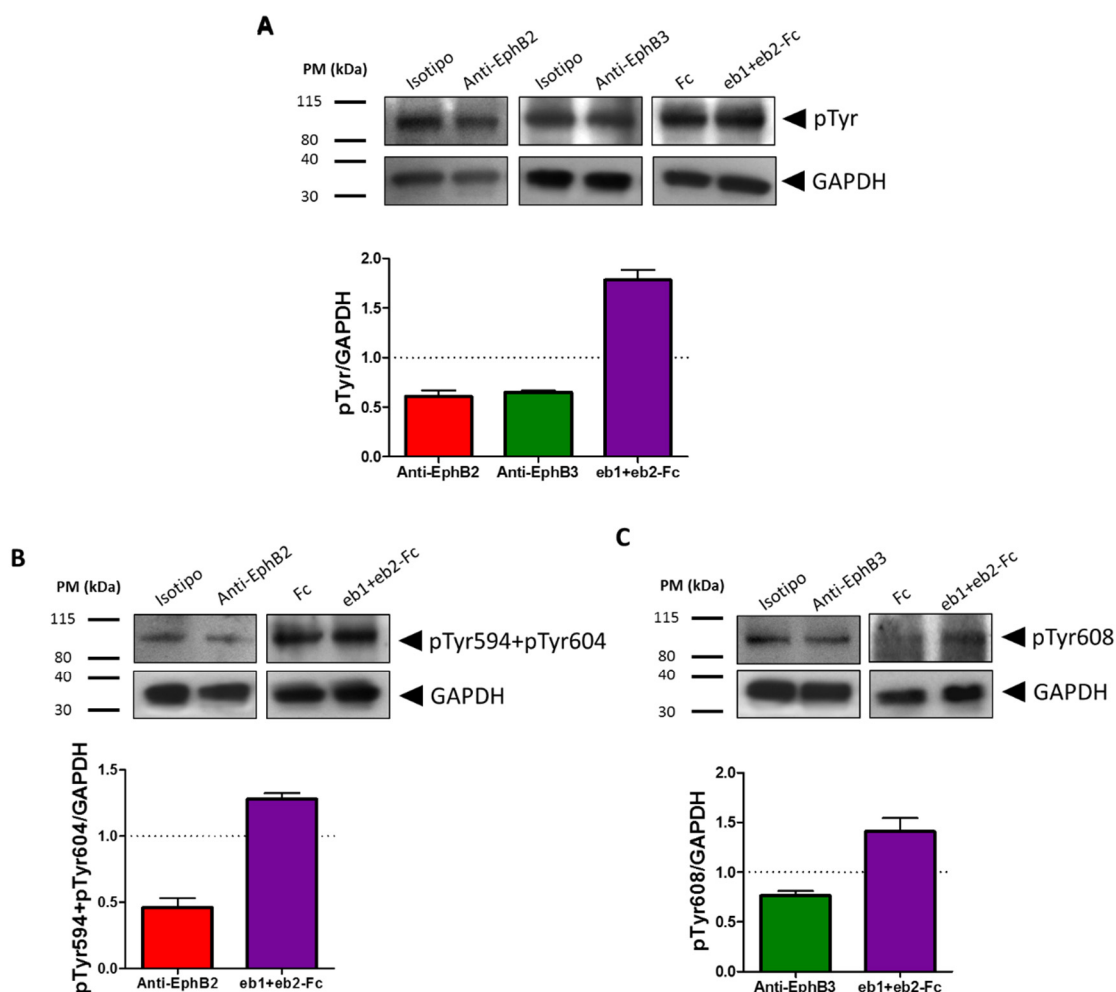


Figura 107. Determinación de los niveles de fosforilación de los receptores EphB2 y EphB3 mediante Western Blot. Las figuras muestran las membranas y la fosforilación relativa de los receptores Eph totales, EphB2 o EphB3 tras el tratamiento con anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 o proteínas de fusión ephrina-B1Fc y ephrina-B2Fc. **A-C.** Las imágenes muestran una membrana representativa de los experimentos realizados donde se detecta la fosforilación total (pTyr) en los receptores Eph (**A**), la fosforilación de la Tirosina 594 y 604 (pTyr594+pTyr604) en los receptores EphB1 y EphB2, respectivamente (**B**) y la fosforilación de la Tirosina 608 (pTyr 608) en el receptor EphB3 (**C**); todos ellos identificados por un peso molecular (PM) de aproximadamente 110KDa. También se muestra en las mismas muestras y condiciones experimentales la identificación de la proteína endógena GAPDH, correspondiente a un PM de 36KDa. Las gráficas muestran los valores relativizados de fosforilación. Nótese como el tratamiento con los anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 provoca una reducción en el grado de fosforilación de las Tirosinas totales (**A**), de las de EphB1+EphB2 (**B**) y de las de EphB3 (**C**), mientras que la activación de estos receptores, tras la estimulación conjunta con las proteínas de fusión ephrina-B1Fc y ephrina-B2Fc, induce el efecto contrario.

Por otro lado, los resultados obtenidos tras la incubación con el anticuerpo anti-EphB3 al analizar los residuos de tirosina fosforilada de EphB3 (pTyr608) fueron similares a los descritos con anti-EphB2, aunque la disminución era algo menor que en el caso de EphB2 (**Fig. 107C**), mientras que la estimulación con las proteínas de fusión inducía nuevamente un incremento de las tirosinas fosforiladas específicas de este receptor (**Fig. 107C**).

En conjunto, estos resultados confirmarían que ambos tipos de anticuerpos pueden ser empleados como anticuerpos bloqueantes de la señalización *forward* de los receptores EphB2 y EphB3, mientras que la estimulación con las proteínas de fusión ephrina-B1Fc y ephrina-B2Fc clusterizadas ejercen el efecto contrario.

Una vez confirmada la naturaleza inhibitoria de la señalización *forward* de EphB2 o EphB3 de los anticuerpos utilizados, realizamos un primer análisis histológico de los cultivos tratados con anti-EphB2 o anti-EphB3, según lo descrito en el apartado 6.4 del Material y Métodos, que reveló, a diferencia de los cultivos establecidos con el control de isotipo, que el tratamiento con los diferentes anticuerpos cursaba con la aparición de áreas medulares K5⁺ (área delimitada punteada, **Fig. 108A**) de menor tamaño y en mayor número, dispersas por el parénquima tímico (K8⁺) (**Fig. 108B, C** flechas). Similares resultados se obtuvieron al analizar las secciones histológicas de RTOCs formados con células WT (**Fig. 108D**) y deficientes en EphB2 (**Fig. 108E**) o EphB3 (**Fig. 108F**).

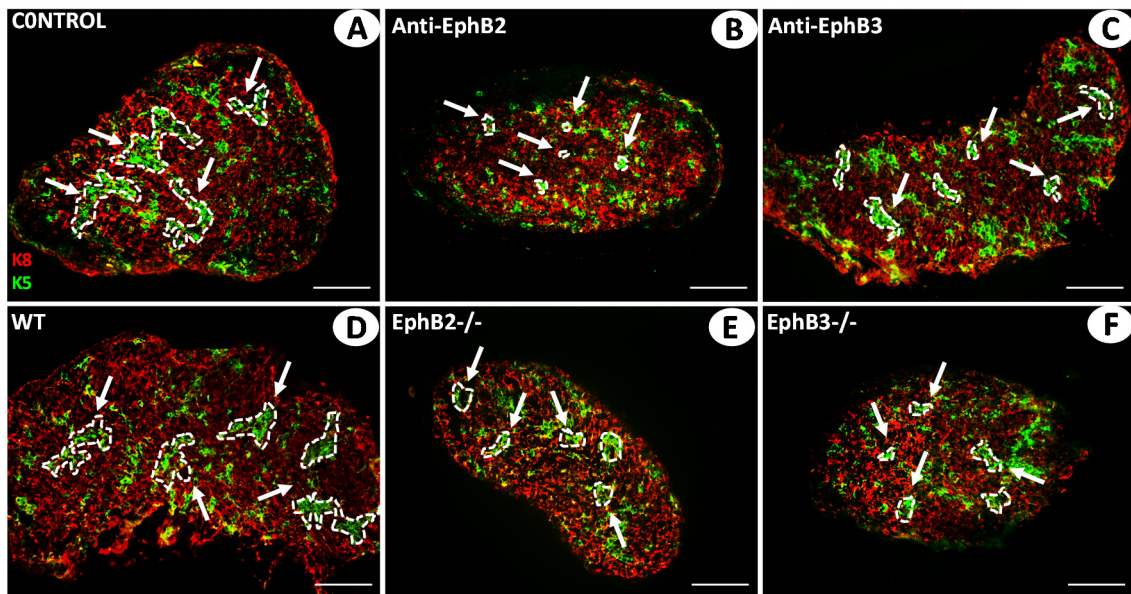


Figura 108. Distribución y tamaño de los focos medulares K5⁺ en diferentes reagregados tratados con anticuerpos anti-EphB o establecidos empleando células deficientes en EphB. (A, B y C) Las imágenes muestran la organización y tamaño de las áreas K5⁺ (flechas) en reagregados empleando células WT tratadas o no (A) con anti-EphB2 (B) o anti-EphB3 (C). Nótese el menor tamaño de las áreas K5⁺ y el mayor número de las mismas distribuidas por el parénquima tímico K8⁺, en comparación con los reagregados control (A). (D, E y F) Las imágenes muestran el tamaño y la distribución de las áreas K5⁺ en reagregados establecidos con células WT (D), deficientes en EphB2 (E) o en EphB3 (F). Nótese, al igual que en el caso anterior, el menor tamaño y la mayor fragmentación de las áreas K5⁺ distribuidas por el parénquima tímico K8⁺ en los reagregados establecidos con células mutantes. Escala: 100µm.

Un posterior análisis morfométrico de las secciones determinó las diferencias cuantitativas existentes en las distintas condiciones experimentales. Los resultados demostraron que el número relativo de áreas K5⁺ por sección histológica aumentaba significativamente en los lóbulos que recibían los anticuerpos con respecto a los controles de isotipo (**Fig. 109A**), mientras que el tamaño de las áreas medulares K5⁺ respecto al tamaño de la sección era significativamente menor (**Fig. 109B**). Estos resultados eran similares a los obtenidos cuando analizábamos comparativamente el número relativo de áreas K5⁺ (**Fig. 109C**) y su tamaño (**Fig. 109D**) en reagregados establecidos con células EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}. Cuando se compararon estos valores entre RTOCs mutantes, el número de áreas K5⁺ por sección era significativamente mayor en los RTOCs EphB2^{-/-} que en los RTOCs EphB3^{-/-} (**Fig. 109C**). Este resultado era similar a lo observado en timos adultos, donde los EphB2^{-/-} tenían áreas medulares más fragmentadas que los timos EphB3^{-/-}.

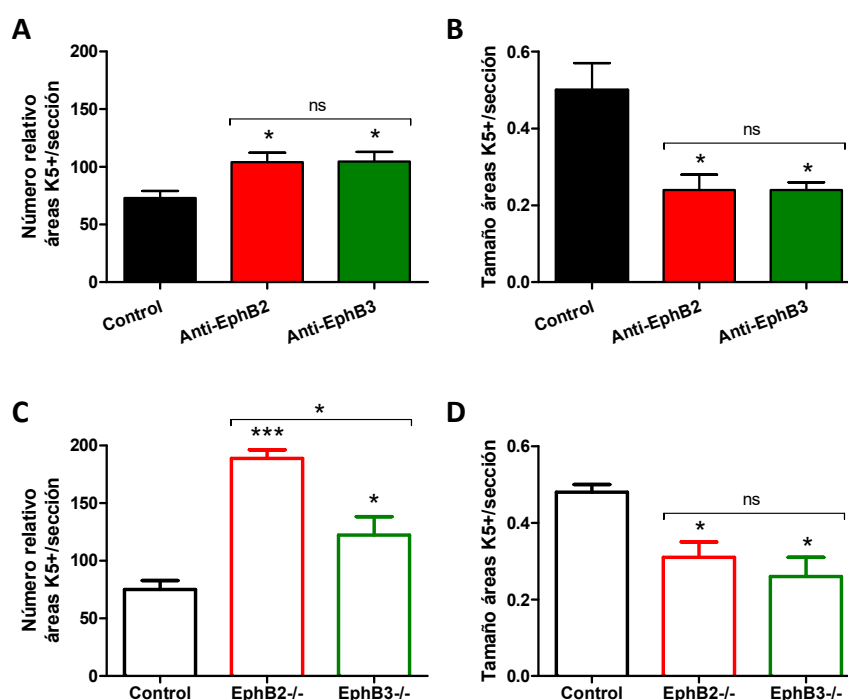


Figura 109. Análisis cuantitativo del número y tamaño relativo de las áreas K5⁺ por sección en RTOCs tratados con anticuerpos anti-EphB, así como en RTOCs establecidos con células deficientes en EphB2 o EphB3. Las gráficas muestran como el tratamiento con anti-EphB2 o anti-EphB3 aumenta el número relativo de áreas K5⁺/sección (**A**) aunque reduce el tamaño de dichas áreas (**B**). Igualmente, los RTOCs establecidos con células EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} presentan un aumento en el número relativo de áreas K5⁺/sección, mucho mayor en EphB2^{-/-} (**C**), con menor tamaño de áreas K5⁺ (**D**). Los datos corresponden a 3 RTOCs para cada una de las condiciones experimentales. Los valores representan la media (\pm SD) de las diferentes imágenes muestreadas. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

1.7. Progenitores epiteliales identificados mediante nuevos marcadores

1.7.1. Poblaciones definidas por la expresión de MTS20 y Cld3,4

Como ya hemos indicado repetidamente MTS20 es un marcador de células inmaduras que contiene, sin duda, progenitores epiteliales (*Bennett y cols., 2002; Gill y cols., 2002*). Por su parte, células epiteliales fetales que expresan fuertemente claudina-3 y claudina-4 (Cld3,4) originan *in vitro* exclusivamente TECs medulares maduras, correspondiendo, por tanto, a progenitores comprometidos con el linaje medular (*Hamazaki y cols., 2007*). Sobre esta base analizamos la población medular Cld3,4⁺ sobre secciones histológicas entre 12.5F y 15.5F en el timo de los animales WT, en combinación con el marcador MTS20.

A 12.5F las células MTS20⁺ estaban distribuidas por todo el parénquima tímico, pero algunas zonas en la región central aparecían más intensamente teñidas (MTS20^{hi}) y en ellas colocalizaban con células Cld3,4^{hi} (**Fig. 110**, inserto). A 13.5F las células MTS20^{hi} se localizaban en pequeños focos en las zonas centrales del parénquima tímico y muchas de ellas coexpresaban de nuevo Cld3,4^{hi} (**Fig. 110**). A partir de 13.5F, con el aumento del área medular, la proporción de las células MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} disminuía hasta prácticamente desaparecer a 15.5F (**Fig. 110**) tal y como han descrito otros autores (*Hamazaki y cols., 2007*). El patrón de distribución de la población MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} en las secciones de los timos mutantes a 12.5F no mostraba diferencias muy evidentes respecto al de timos WT (**Fig. 110**). Sin embargo, a partir de 14.5F y, más claramente a 15.5F, era evidente que los timos mutantes contenían una mayor proporción de células MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} distribuidas por el parénquima tímico, lo que demostraba el retraso en su maduración con respecto a los timos WT (**Fig. 110**).

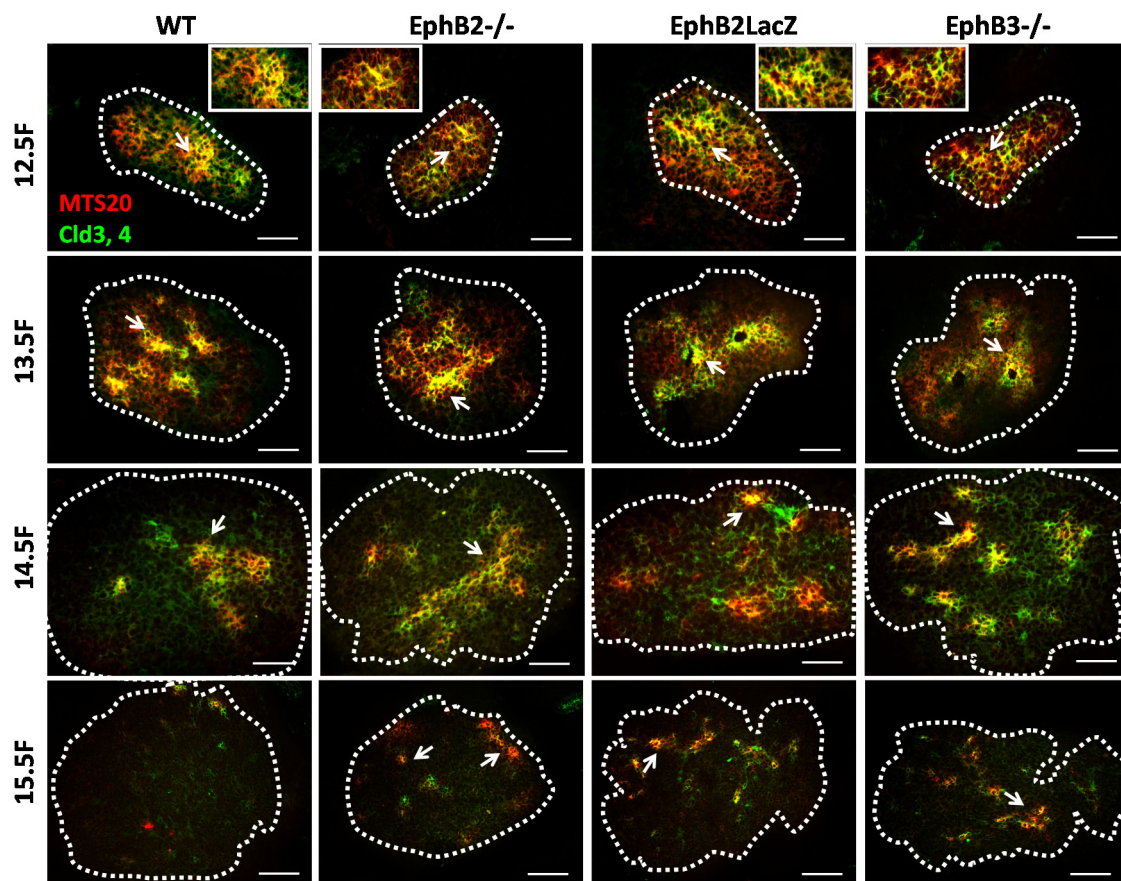


Figura 110. Expresión de los marcadores MTS20 y Claudinas 3,4 (Cld3,4) en el timo de ratones WT y deficientes en EphB desde 12.5F a 15.5F. Las imágenes muestran como en timos WT a 12.5F la expresión de MTS20 está distribuida por todo el parénquima tímico, aunque en las regiones centrales el marcaje MTS20 es más intenso (rojo) y algunas de estas células colocalizan (células amarillas, flecha, inserto) con células Cld3,4^{hi} (verde). A partir de 13.5F se observan pequeños focos MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} dispersos por el parénquima tímico que disminuyen hasta desaparecer prácticamente a 15.5F. Esta evolución es similar en los timos mutantes pero, sin embargo, en todos ellos hay una mayor proporción de células MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} (amarillo) particularmente evidente a 14.5F y 15.5F. El área tímica completa está delimitada por la línea de puntos. Escala: 12.5F, 13.5F y 14.5F: 50µm; 15.5F: 100µm.

Puesto que se ha descrito (*Hamazaki y cols., 2007*) que en el timo postnatal se produce una nueva expansión de las células Cld3,4 que aumentan en número con respecto a los estadios anteriores y que es necesaria para la expansión postnatal de la médula tímica, analizamos la expresión de Cld3,4 y MTS20 en los timos WT y mutantes a 7PN para determinar si tal expresión se veía alterada en este periodo. Este análisis no se realizó a 17.5F ya que en este estadio apenas había expresión para ambos marcadores (datos no mostrados).

En el timo de los animales WT, como se observa en la **Figura 111**, había un notable incremento en la proporción de células MTS20⁺ y Cld3,4⁺ respecto a la condición de los timos de 15.5F (**Fig. 110**). Curiosamente en estos timos postnatales no todas las células Cld3,4⁺ eran MTS20, más bien la proporción de células dobles positivas era muy baja. Dentro de las células Cld3,4⁺ se identificaban varias poblaciones en función de su intensidad (Cld3,4^{hi} y Cld3,4^{lo/med}). Cuando se analizó la aparición de las células Cld3,4⁺ en los timos mutantes se observaban las mismas poblaciones que en los WT, pero la proporción de células Cld3,4^{hi} parecía reducida en los timos deficientes en EphB (**Fig. 111**).

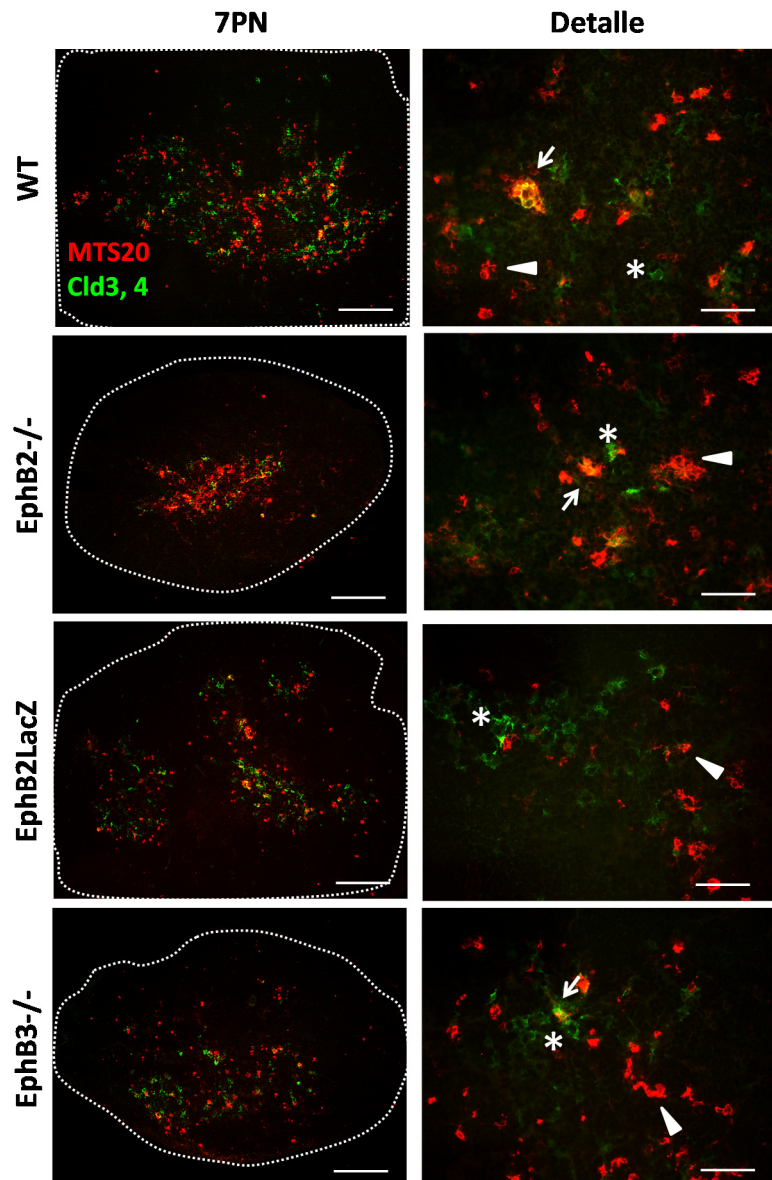


Figura 111. Expresión de los marcadores MTS20 y Claudinas 3,4 (Cld3,4) en el timo de ratones WT y deficientes en EphB a 7PN. A 7PN, los timos WT presentan un incremento en la proporción de células MTS20⁺ (rojo) y Cld3,4⁺ (verde) con respecto a la expresión observada a 15.5F (**Fig. 110**). Estas células se localizan en grupos celulares correspondientes a áreas medulares. En el interior de estas zonas se observa algunas células MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} (flecha), pero también células MTS20^{hi}Cld3,4^{lo} (cabeza flecha) y MTS20^{lo}Cld3,4^{lo} (asterisco). En los timos mutantes, se observan las mismas poblaciones y distribución pero parecían contener un menor número de células Cld3,4^{hi} totales con respecto al tamaño de la sección tímica (delimitado por la línea de puntos). Escala: 7PN: 200µm; Detalle: 50µm.

En base a estos resultados, cuantificamos el área ocupado por las células Cld3,4^{hi} totales con respecto a la sección tímica total identificada por la expresión de K8 (marcaje no mostrado) correspondiente a todo el órgano. Este análisis morfométrico puso de manifiesto que los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} mostraban una reducción significativa en la proporción de células Cld3,4^{hi} totales con respecto a los WT (**Fig. 112**), mientras que los EphB2LacZ, aunque tenían valores menores que los WT, las diferencias no eran significativas. Estos resultados demostrarían que la falta de EphB2 o EphB3 alteraba la correcta expansión de la población Cld3,4⁺ postnatal.

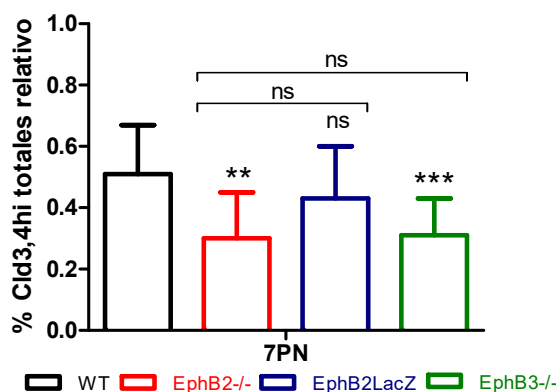


Figura 112. Proporción del área ocupado por células Cld3,4^{hi} totales respecto al tamaño de la sección tímica a 7PN en animales WT y mutantes en EphB. La proporción del área ocupado por células Cld3,4^{hi} totales respecto al tamaño de la sección tímica es significativamente menor en los timos mutantes EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero no en los EphB2LacZ respecto a los valores WT, aunque estos últimos muestran un porcentaje ligeramente menor. No hay diferencias entre los valores de los timos mutantes. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de 3 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

1.7.2. Análisis de la población Cld3,4^{hi}SSEA1⁺

Nuevos datos sobre los progenitores del epitelio medular tímico han identificado recientemente a 14.5F una subpoblación de células Cld3,4^{hi} que expresan el marcador SSEA1 (un marcador de células madre embrionarias en ratón) (*Sekai y cols., 2014*). Dicha población celular era auto-renovable, clonogénica, y mostraba capacidad para generar células epiteliales medulares maduras, una propiedad que decrecía rápidamente tras el nacimiento. Analizamos entonces, por citometría de flujo, la proporción de estas células tanto en timos WT como en mutantes a 14.5F y 17.5F. Tal y como muestran los *dot plots* de la **Figura 113**, la proporción de células Cld3,4^{hi}SSEA1⁺ en los timos WT aumentaba entre 14.5F y 17.5F (**Fig. 114**) de forma significativa (datos no mostrados). Cuando analizábamos esta población en los mutantes, observábamos

que la población progenitora $\text{Cld3,4}^{\text{hi}}\text{SSEA1}^+$ era significativamente mayor en todos a 14.5F, pero no a 17.5F (**Fig. 114**). Tampoco, existían diferencias entre timos mutantes.

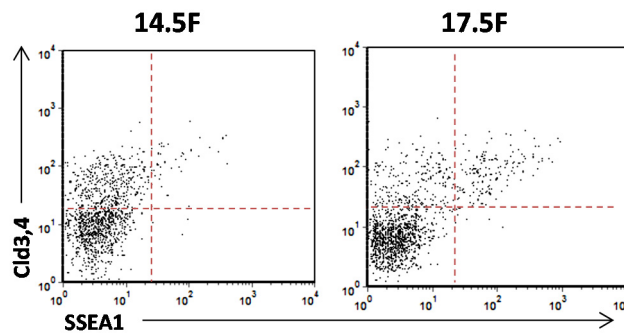


Figura 113. Evolución de la población epitelial $\text{Cld3,4}^{\text{hi}}\text{SSEA1}^+$ a 14.5F y 17.5F en timos WT. Los *dot plots* muestran un ejemplo de la presencia de células $\text{Cld3,4}^{\text{hi}}\text{SSEA1}^+$ dentro de la población epitelial total $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$ a 14.5F y 17.5F en timos WT. Nótese como incrementa la proporción de estas células entre ambos estadios. Los *dot plots* son un ejemplo representativo de los valores observados en cada estadio.

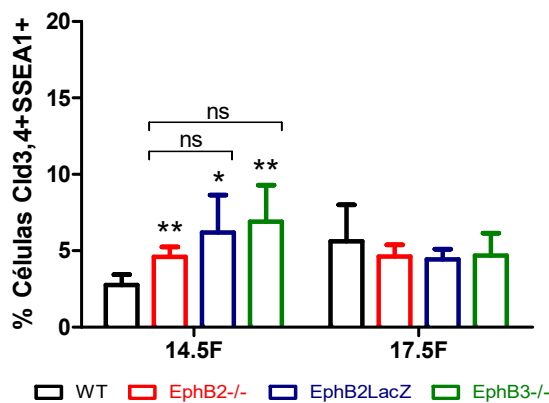


Figura 114. Presencia de células $\text{Cld3,4}^{\text{hi}}\text{SSEA1}^+$ a 14.5F y 17.5F en timos WT y deficientes en EphB. En los timos WT la proporción de células $\text{Cld3,4}^{\text{hi}}\text{SSEA1}^+$ incrementa entre 14.5F y 17.5F pero no en timos mutantes que muestran valores similares o ligeramente más bajos a 17.5F con respecto a 14.5F, en relación con la significativa acumulación de células $\text{Cld3,4}^{\text{hi}}\text{SSEA1}^+$ a 14.5F al comparar con los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Estos resultados demostrarían un retraso inicial en la maduración de estos progenitores medulares $\text{Cld3,4}^{\text{hi}}\text{SSEA1}^+$ en los timos mutantes, que se acumulaban a 14.5F resultando en valores similares o aún más bajos a 17.5F cuando en los timos WT la población aumentaba.

1.7.3. Análisis de las poblaciones de TECs definidas en base a la expresión de integrina- $\alpha 6$ y Sca-1

Utilizamos a continuación la expresión de los marcadores integrina- $\alpha 6$ ($\alpha 6$; CD49f) y Sca-1, recientemente descritos por definir nuevas poblaciones de progenitores epiteliales en timo postnatal, para profundizar en el análisis del fenotipo de los timos deficientes en EphB. Estudios previos ya habían confirmado la existencia, tanto en el timo postnatal como adulto, de progenitores epiteliales con capacidad para generar células del linaje cortical y medular (*Bleul y cols., 2006*) pero, sólo recientemente Wong

y colaboradores (Wong y cols., 2014) han demostrado que el timo adulto de ratón contiene una subpoblación de células con una fuerte expresión de $\alpha 6$ y Sca-1 ($\alpha 6^{\text{hi}}$ /Sca-1^{hi}) dentro de una subpoblación de células epiteliales corticales inmaduras denominadas cTEC^{lo} (MHCII^{lo}UEA1⁻). Estas células son capaces *in vivo* de auto-renovarse y dar lugar a las diferentes subpoblaciones epiteliales tanto corticales como medulares caracterizadas por la expresión de MHCII y UEA1 (Wong y cols., 2014).

En base a estos resultados y a los descritos en apartados anteriores de este trabajo donde se demostraba la acumulación de diferentes células epiteliales progenitoras en estadios fetales tempranos (MTS20⁺, Cld3,4⁺MTS20⁺), pero no en estadios fetales tardíos y postnatales (Cld3,4⁺MTS20⁺ y Cld3,4⁺SSEA1⁺); analizamos a 17.5F y 7PN mediante citometría de flujo y dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻, la aparición y evolución de esta población $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi} en timos WT y mutantes.

Tal y como muestran los *dot plots* de la **Figura 115** a 17.5F en el timo de los animales WT, la población epitelial mayoritaria era $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1⁻ (1). En este estadio existían también una baja proporción de células $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{med} (2) y $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{hi} (3), $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{med} (4) y $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi} (5). A 7PN (**Fig. 115**), la población $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1⁻ era prácticamente inexistente debido a la expansión de las poblaciones $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{med} y $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{hi}, pero también por la aparición de células que expresaban $\alpha 6^{\text{hi}}$ y diferentes niveles de Sca-1. Así, a 7PN podíamos definir cuatro poblaciones epiteliales principales en base a estos marcadores: $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{med} (2), $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{hi} (3), $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{med} (4) y $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi} (5). En este estadio la proporción de células $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi} fue relativamente baja (algo menos de un 13%), siendo la población mayoritaria la $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{hi} (algo menos de un 40%). Los resultados de la población progenitora $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi} son bastante similares a los publicados por Wong y colaboradores (Wong y cols., 2014) para el estadio de 3PN y adulto. Sin embargo, en nuestro análisis los resultados obtenidos para las poblaciones $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{med} y $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{hi} difieren de los de estos autores, mostrando porcentajes menores en la primera y mayores en la segunda población, posiblemente debido a que nuestro análisis se realizó a 7PN en vez de a 3PN.

Analizando estas subpoblaciones en los timos mutantes, observábamos como a 17.5F y 7PN la aparición y evolución de estas células era prácticamente igual al patrón WT (**Fig. 115**). A 17.5F, igual que en los timos WT, en los mutantes la población $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi}

estaba muy poco representada (**Fig. 116A**); sin embargo, todos ellos mostraban valores ligeramente superiores, aunque de forma significativa únicamente en el caso de EphB2^{-/-} (**Fig. 116A**). Por otro lado, analizando la población mayoritaria en este estadio ($\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^-$) en todos los tipos mutantes estaba ligeramente reducida, pero de forma significativa con respecto a los valores WT (**Fig. 116B**). La reducción en esta subpoblación cursaba además con incrementos en la población $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ en los tipos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ (**Fig. 116C**), de manera significativa en este último caso y en la población $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ en los tipos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} de manera significativa en los primeros (**Fig. 116D**). Por último, no se observaron diferencias en la población $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ (**Fig. 116E**).

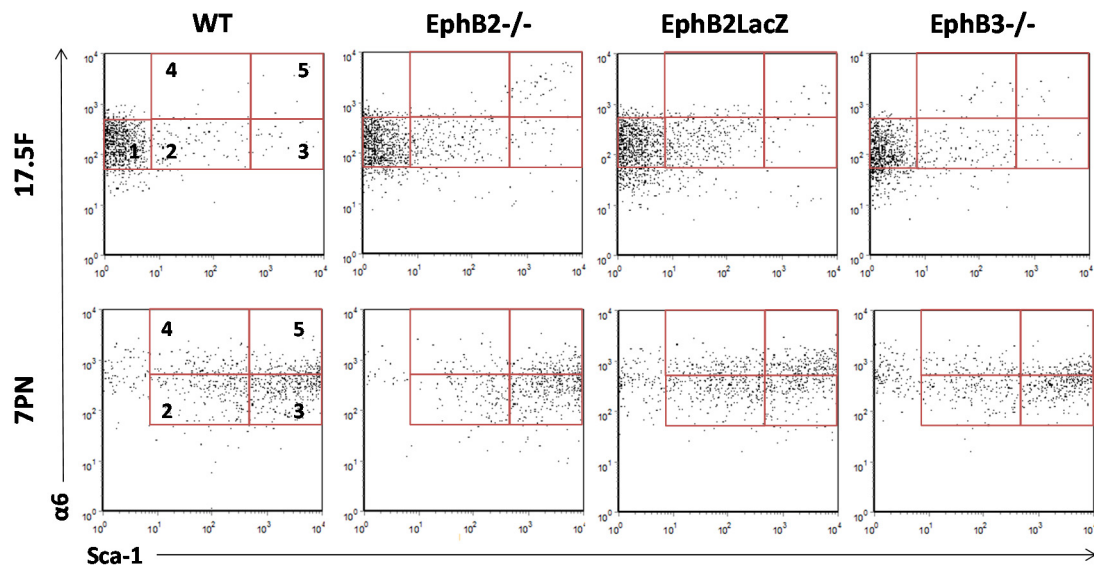


Figura 115. Aparición y evolución de las diferentes subpoblaciones epiteliales en base a la expresión de los marcadores integrina- $\alpha 6$ ($\alpha 6$) y Sca-1 a 17.5F y 7PN en tipos WT y deficientes en EphB. Se analizó la aparición y evolución de diferentes subpoblaciones $\alpha 6$ y Sca-1 dentro de la población epitelial total (EpCAM⁺CD45⁺) en los tipos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} a 17.5F y 7PN. A 17.5F la población principal es $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^-$ (1), con una baja proporción de células $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ (2), $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ (3), $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ (4) y $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ (5). A 7PN las células $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^-$ son prácticamente inexistentes debido al aumento de las células $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ (2) y $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ (3), pero también a la aparición de células $\alpha 6$ high: $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ (4), $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ (5). Nótese una aparente evolución similar de estas subpoblaciones en los tipos mutantes con respecto al patrón WT. Los dot plots son representativos de los valores analizados para cada estadio.

Al analizar a 7PN la población progenitora $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ (**Fig. 117**) en los tipos mutantes con respecto a los valores WT, no observábamos diferencias en los tipos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero si un aumento significativo en los tipos EphB2LacZ, mayor también con respecto a EphB2^{-/-}.

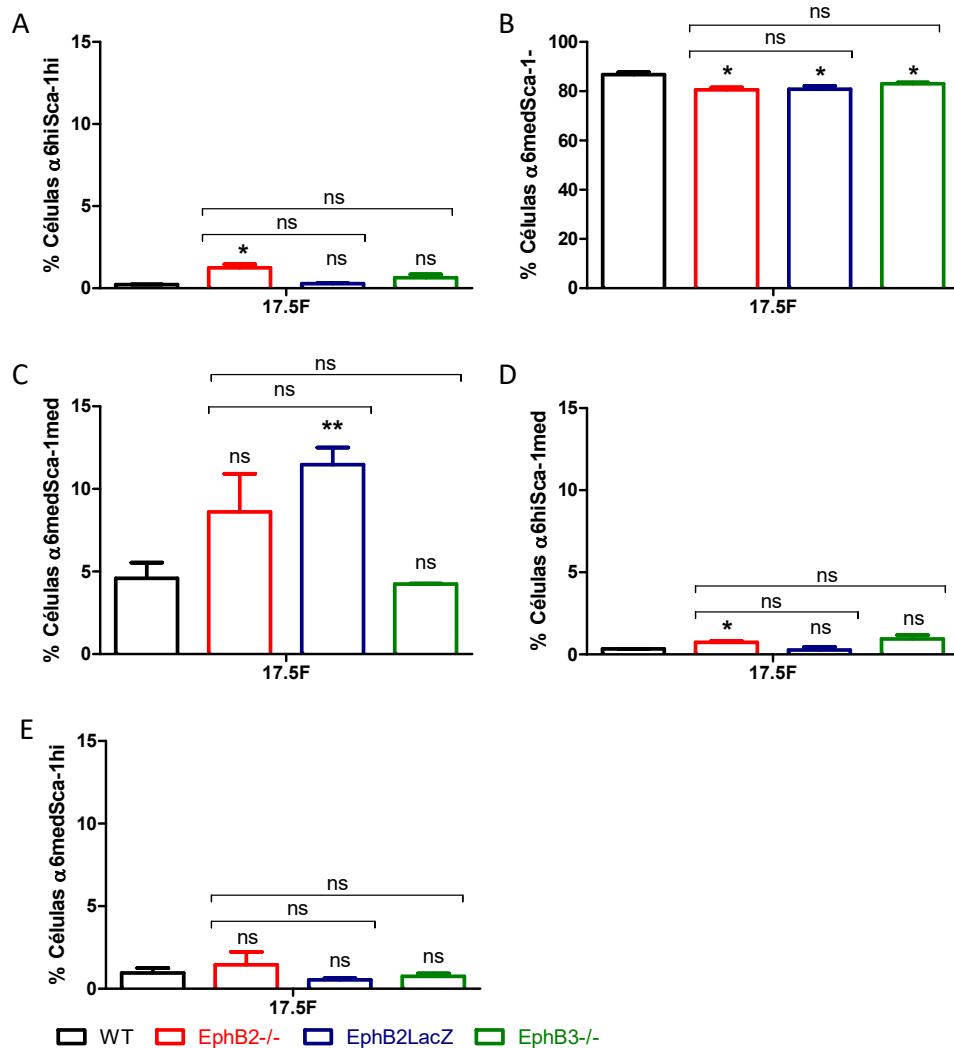


Figura 116. Proporción de células α6^{hi}Sca-1^{hi}, α6^{med}Sca-1⁻, α6^{med}Sca-1^{med}, α6^{hi}Sca-1^{med} y α6^{med}Sca-1^{hi} en timos WT y deficientes en EphB a 17.5F. La gráfica muestra como (A) la proporción de células α6^{hi}Sca-1^{hi} es significativamente más alta sólo en los timos EphB2^{-/-} respecto a los timos WT, sin diferencias con el resto de mutantes. (B) Los porcentajes de células α6^{med}Sca-1⁻ son significativamente menores en todos los mutantes respecto a los timos WT. (C) El porcentaje de células α6^{med}Sca-1^{med} es mayor en los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ respecto a los WT, aunque sólo significativamente en los últimos. (D) La proporción de células α6^{hi}Sca-1^{med} es significativamente mayor sólo en los timos EphB2^{-/-} que en los timos WT, sin diferencias con el resto de mutantes. (E) No se observan diferencias en la población α6^{med}Sca-1^{hi}. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *p<0.05; **p<0.01 según el análisis estadístico de la t de Student.

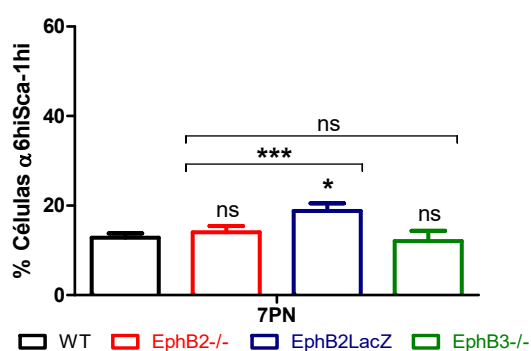


Figura 117. Proporción de células α6^{hi}Sca-1^{hi} a 7PN en timos WT y deficientes en EphB. La gráfica muestra como la proporción de células α6^{hi}Sca-1^{hi} es prácticamente similar entre los timos WT y EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero significativamente mayor en los timos EphB2LacZ respecto a los timos WT y EphB2^{-/-}. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *p<0.05; ***p<0.005 según el análisis estadístico de la t de Student.

Analizando el resto de subpoblaciones epiteliales en los timos deficientes en EphB, observábamos diferencias puntuales tanto entre mutantes como en subpoblaciones concretas. Así, la subpoblación $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ (**Fig. 118A**) no estaba afectada en los timos EphB3^{-/-}, pero era significativamente menor en los timos EphB2^{-/-} y mayor en los EphB2LacZ. Al comparar entre mutantes observábamos que estas células disminuían significativamente en los timos EphB2^{-/-} respecto de los valores EphB2LacZ y EphB3^{-/-} (**Fig. 118A**). Por otro lado, las células $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ (**Fig. 118B**) estaban significativamente incrementadas en los timos EphB2^{-/-} pero reducidas en los EphB2LacZ y EphB3^{-/-} con respecto a los WT. Al comparar entre mutantes, los timos EphB2^{-/-} presentaban valores significativamente más altos que los otros dos (**Fig. 118B**). Finalmente, no había diferencias en la subpoblación $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ (**Fig. 118C**) en los timos EphB2^{-/-} ni EphB3^{-/-}, pero si un ligero incremento significativo en los timos EphB2LacZ respecto de los valores WT, sin diferencias con los otros mutantes (**Fig. 118C**).

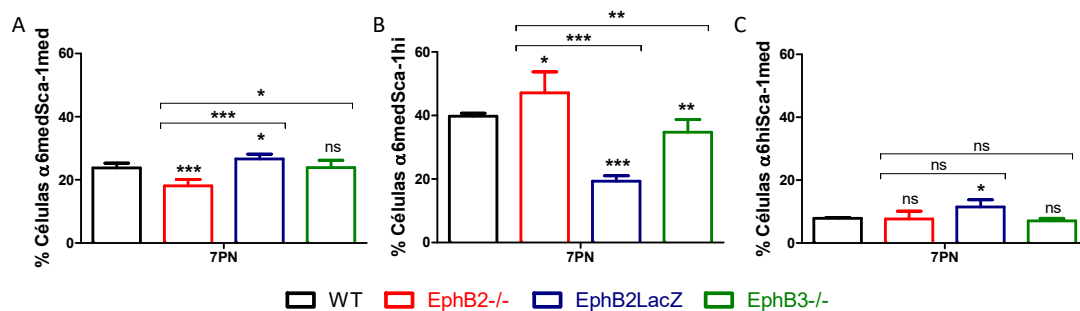


Figura 118. Proporción de células $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$, $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$, y $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ a 7PN en timos WT y deficientes en EphB. La gráfica muestra como (A) la proporción de células $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ es significativamente menor en los timos EphB2^{-/-} y mayor en los EphB2LacZ, pero no en los EphB3^{-/-} respecto a los timos WT. Los timos EphB2^{-/-} presentan valores significativamente menores que los EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (B) La proporción de células $\alpha 6^{\text{med}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ en los timos EphB2^{-/-} es significativamente más alta que en los timos WT, mientras que en los EphB2LacZ y EphB3^{-/-} es significativamente menor. Los timos EphB2^{-/-} presentan valores significativamente mayores que los EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. (C) El porcentaje de células $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{med}}$ sólo es significativamente mayor en los timos EphB2LacZ respecto a los WT, sin que existan diferencias significativas al comparar con el resto de mutantes. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados en cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Estos resultados indicarían que la falta de EphB2, en mayor medida que la de EphB3, cursa con un mayor porcentaje de las células epiteliales con capacidad progenitora $\alpha 6^{\text{hi}}\text{Sca-1}^{\text{hi}}$ durante el periodo fetal tardío pero no durante el periodo postnatal tal y como hemos observado con otros marcadores; además, la recuperación de la señal

reverse en los timos EphB2LacZ, favorecería una acumulación de estas células en este periodo.

1.7.4. Análisis de la población Podoplanina⁺

Para finalizar el análisis fenotípico de las células epiteliales tímicas, realizamos un estudio sobre secciones histológicas de timos 7PN, donde analizamos la expresión de la molécula podoplanina (PDPN). La PDPN es una proteína integral de membrana tipo II que es reconocida por el anticuerpo 8.1.1 (*Farr y cols., 1992*) y que, recientemente, ha definido un precursor (PDPN⁺) comprometido con TECs medulares que se localiza en el borde córtico-medular (BCM) (*Onder y cols., 2015*). Como hemos descrito en apartados anteriores de este trabajo, la falta de las distintas EphB cursaba con retraso en la maduración de varias poblaciones epiteliales inmaduras, por lo que evaluamos cuál era la condición de esta molécula en los timos mutantes. Para ello combinamos la expresión de PDPN junto con la del marcador medular K5, y la del cortical Ly51 para poder definir así mejor su posible localización en el BCM.

La PDPN en el timo de los animales WT 7PN (**Fig. 119**) se expresaba fundamentalmente en el área medular K5⁺ (línea punteada), con una escasa o nula presencia en el compartimento cortical Ly51⁺, restringiéndose en esta región principalmente a la cápsula tímica y a la subcápsula (**Fig. 119A, B**). A mayores aumentos, junto con la expresión de los marcadores K5 y Ly51, pudimos definir diferentes subpoblaciones celulares en base a la expresión de PDPN (**Fig. 119C**). Así, en el área medular observábamos una población mayoritaria Ly51^{-/lo}K5⁺PDPN⁺ localizada en regiones más internas junto con células Ly51⁻K5⁺PDPN^{-/lo} y Ly51^{-/lo}K5⁺PDPN^{hi} distribuidas por la periferia de la misma y próximas al BCM. Por otro lado, analizando el BCM definido por la coexpresión de Ly51 y K5 observábamos que en las regiones más próximas al compartimento medular aparecían, de forma aislada, células Ly51⁺K5⁺PDPN⁺, pero también Ly51⁺K5^{-/lo}PDPN⁺. Las primeras podrían considerarse células más inmaduras por expresar los tres marcadores y las que, por tanto, podrían ser progenitoras. Por el contrario, las últimas podrían corresponder a células estromales no epiteliales que rodean los vasos sanguíneos del BCM tal y como definieron Lucas y colaboradores mediante citometría de flujo (*Lucas y cols., 2015*). Por otro lado, el compartimento

cortical $\text{Ly51}^+\text{K5}^-\text{PDPN}^-$ presentaba algunas células $\text{Ly51}^+\text{K5}^+\text{PDPN}^-$ dispersas y una población PDPN^+ restringida a la cápsula y subcápsula, como ya hemos dicho, donde aparecían como células $\text{Ly51}^-\text{K5}^-\text{PDPN}^+$ y también algunas $\text{Ly51}^+\text{K5}^-\text{PDPN}^+$.

El análisis de las poblaciones PDPN^+ en los timos mutantes resultó difícil debido a su desorganización histológica impidiéndonos realizar un estudio cuantitativo como el realizado con otros marcadores. Sin embargo, un análisis preliminar de estos timos mostraba un patrón general de expresión para la PDPN similar al descrito en los timos WT, con una expresión clara en el compartimento medular (**Fig. 119**, línea puntos) y en las regiones capsular y subcapsular (**Fig. 119,***). A más detalle, observábamos que en esta última región no existían diferencias con el patrón descrito en los timos WT, apareciendo las mismas subpoblaciones ($\text{Ly51}^-\text{K5}^-\text{PDPN}^+$ pero también algunas $\text{Ly51}^+\text{K5}^-\text{PDPN}^+$). Sin embargo, en el compartimento medular aunque se mantenía el patrón WT y las mismas subpoblaciones, había algunas diferencias. Así, aunque en todos ellos la población medular $\text{Ly51}^{-/\text{lo}}\text{K5}^+\text{PDPN}^{\text{hi}}$ estaba restringida a la periferia del compartimento, en los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ parecía estar reducida y en los timos $\text{EphB3}^{-/-}$ en algunas secciones, parecían sustituidas por células $\text{Ly51}^{-/\text{lo}}\text{K5}^-\text{PDPN}^+$. Por otro lado, en ambos timos mutantes parecía haber una menor proporción de células $\text{Ly51}^{-/\text{lo}}\text{K5}^+\text{PDPN}^+$, pero no en los EphB2LacZ . Por último, en el BCM de los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ parecía haber más células $\text{Ly51}^+\text{K5}^{-/\text{lo}}\text{PDPN}^+$ que en los WT.

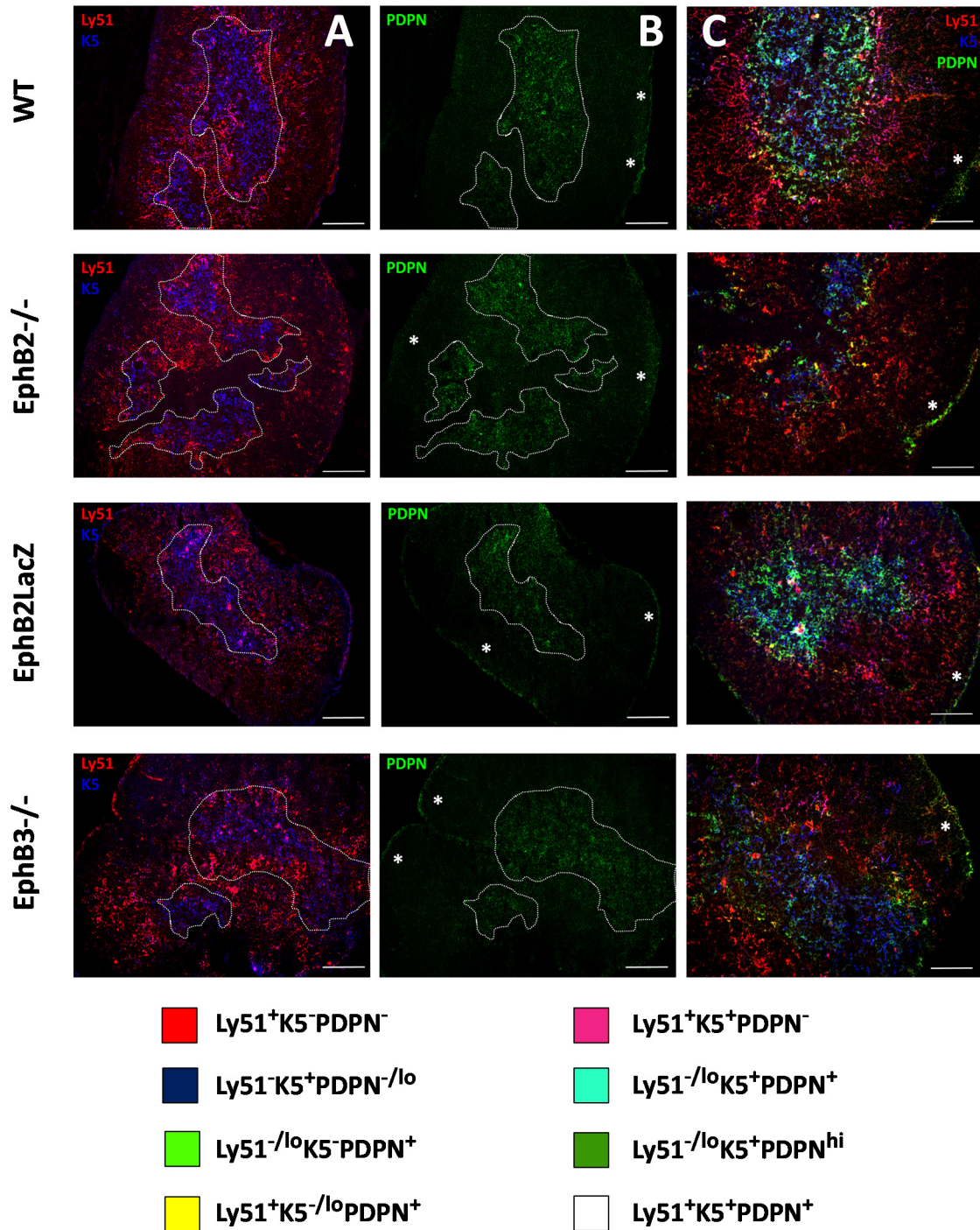


Figura 119. Expresión de podoplanina en el timo de 7PN de ratones WT y deficientes en EphB. Las imágenes muestran como la expresión de las células podoplanina⁺ (verde), tanto en timos WT como en mutantes, está restringida fundamentalmente a la cápsula (*) y a las áreas medulares K5⁺ (azul, línea de puntos), definiéndose en estas áreas diferentes subpoblaciones en base a la expresión de los marcadores utilizados, Ly51, K5 y PDPN. La figura (A), muestra una panorámica de una sección tímica definida por la expresión de Ly51 y K5, mientras que (B), muestra la expresión en la misma sección de PDPN; (C), detalle de una región cortical y medular. Escala: Ly51/K5 y PDPN: 200µm; Ly51/K5/PDPN: 100µm.

2. ORIGEN DE LOS DEFECTOS OBSERVADOS EN LOS TIMOS DEFICIENTES EN EPHB

2.1. Baja celularidad de los timos deficientes en EphB

2.1.1. Papel de las células linfoides

Como indicábamos en apartados anteriores, los distintos timos deficientes en EphB presentaban desde 13.5F una baja celularidad tímica (**ver Fig. 2**) junto con una reducción desde 12.5F en la proporción (**ver Fig. 6**) y número de células CD45⁺ (**ver Fig. 10**), en su inmensa mayoría linfocitos T. Quisimos determinar, por consiguiente, si esta reducción en la celularidad y en el porcentaje de la población CD45⁺ en estos mutantes podría ser una consecuencia, aparte de alteraciones en el ciclo y la muerte celular que luego comentaremos, de un menor porcentaje de progenitores linfoides CD45⁺ en los timos mutantes lo que podría, a su vez, afectar de algún modo el correcto desarrollo del epitelio tímico. Intentaremos, por tanto, en este apartado conocer si las alteraciones descritas en el desarrollo del epitelio tímico pueden correlacionarse con otras en los progenitores linfoides que lo colonizan y su descendencia más temprana, las células DN, cuyo papel en el desarrollo del epitelio tímico sobre todo cortical, ha sido puesto de relieve en repetidas ocasiones (*Hollander y cols., 1995; Shakib y cols., 2009*).

2.1.1.1. Alteraciones en las células progenitoras linfoides PIR^{A/B+} y en timocitos DN

Para identificar la subpoblación de células progenitoras que colonizan el primordio tímico se empleó el marcador PIR^{A/B} (*paired immunoglobulin-like receptor*) (*Masuda y cols., 2005; Desanti y cols., 2011*), un receptor glicoproteico de transmembrana que presenta dos isoformas (A y B) y que es específico de progenitores de células T, células NK y DC (*Masuda y cols., 2005*). En nuestro estudio combinamos la expresión de PIR^{A/B} con la del marcador de células hematopoyéticas (CD45), definiendo las células progenitoras linfoides como células CD45⁺PIR^{A/B+} como han hecho otros autores (*Jenkinson y cols., 2007*). Como se muestra en la **Figura 120**, en los timos WT de 12.5F la inmensa mayoría de células CD45⁺ expresaban el marcador PIR^{A/B} (CD45⁺PIR^{A/B+}), aunque también existía una baja proporción de células CD45⁺PIR^{A/B-}, que

corresponderían a células de otros linajes hematopoyéticos que también colonizan el primordio tímico temprano (*Douagi y cols., 2002*). Por lo tanto, a 12.5F las células CD45⁺ tímicas descritas en apartados anteriores corresponderían en su práctica totalidad a progenitores linfoides CD45⁺PIR^{A/B+}.

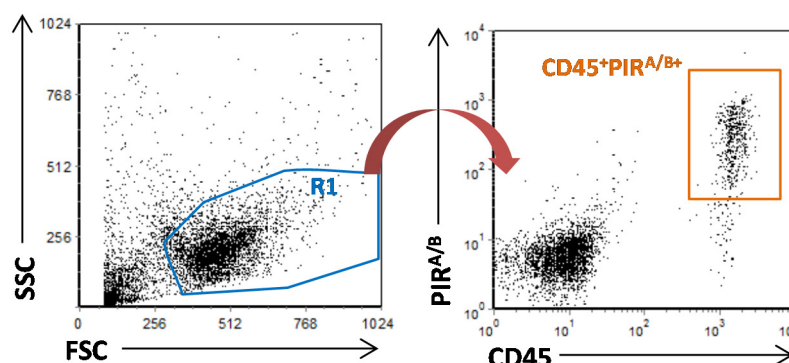


Figura 120. Identificación de progenitores linfoides tempranos en base a la expresión del marcador PIR^{A/B} en el timo de 12.5F. Se delimitó la región R1 como la población tímica total en base a su tamaño y complejidad (FSC-SSC) y a partir de ella, se identificó la población linfóide progenitora en base a la expresión de los marcadores CD45 y PIR^{A/B} (CD45⁺PIR^{A/B+}). Los dot plots son un ejemplo representativo de los valores analizados.

Cuando analizábamos la población CD45⁺PIR^{A/B+} en los timos mutantes, observábamos en todos un porcentaje significativamente menor de estas células, sin diferencias de los valores mutantes entre sí (**Fig. 121A**), al igual que cuando analizábamos los números absolutos de dichas células (**Fig. 121B**). En este estadio, por tanto, las diferencias observadas en la proporción de células tímicas CD45⁺ podrían deberse principalmente a esta reducción de progenitores CD45⁺PIR^{A/B+}.

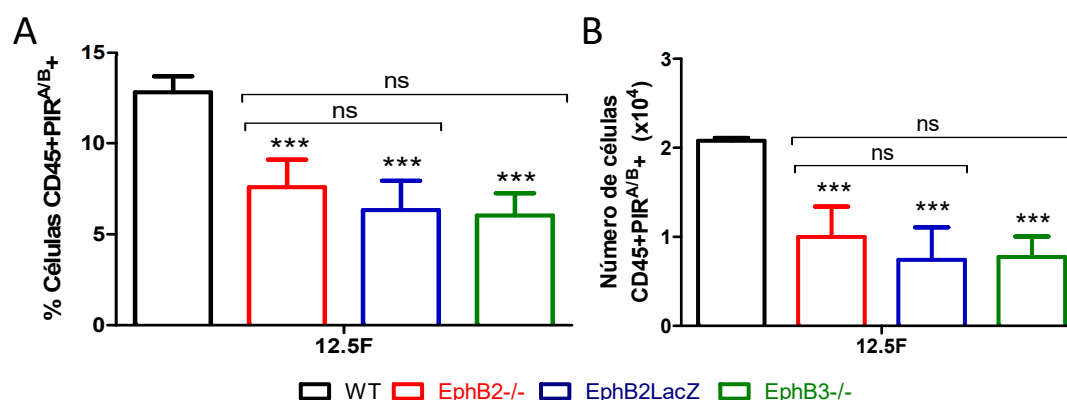


Figura 121. Porcentaje y número absoluto de células CD45⁺PIR^{A/B+} en los timos de 12.5F WT y deficientes en EphB. Los timos deficientes en EphB tienen un porcentaje (A) y número (B) de células CD45⁺PIR^{A/B+} significativamente menor que los timos WT, sin que existan diferencias entre sí entre los distintos mutantes analizados. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *** $p \leq 0.005$, según el análisis estadístico de la t de Student.

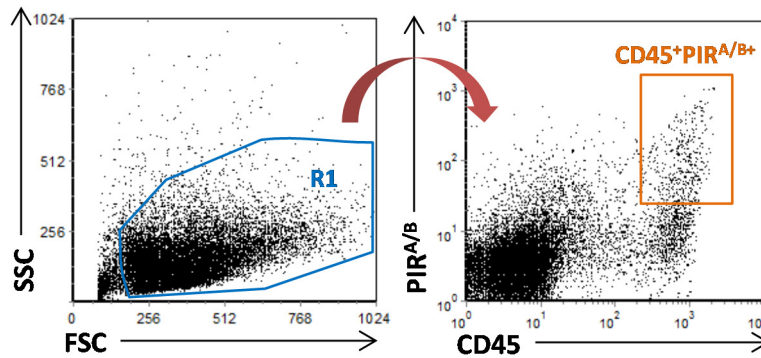


Figura 122. Presencia de progenitores $CD45^+PIR^{A/B+}$ en el hígado de 12.5F. Se delimitó la región R1 como la población hepática total en base a su tamaño y complejidad (FSC-SSC), y se identificó en ella la población progenitora $CD45^+PIR^{A/B+}$ de acuerdo a la expresión de los marcadores CD45 y $PIR^{A/B}$. Los *dot plots* son un ejemplo representativo de los valores analizados.

A su vez, el menor porcentaje de células $CD45^+PIR^{A/B+}$ encontrado en los timos mutantes podría ser debido a varias causas, entre ellas, a su menor presencia en el hígado fetal en estos ratones, desde donde colonizan el timo (Douagi y cols., 2002). Como se observa en la **Figura 122**, a 12.5F en el hígado de los animales WT había una importante población de células $CD45^+PIR^{A/B-}$ que correspondería a otros linajes hematopoyéticos, pero también una pequeña proporción de células $CD45^+PIR^{A/B+}$ (2%, **Fig. 123**), menor que la observada en el timo (12%, **Fig. 121**).

Cuando analizamos la población $CD45^+PIR^{A/B+}$ en el hígado de los animales mutantes no observamos diferencias con respecto a los valores WT, lo que demostraba que el menor porcentaje de células $CD45^+PIR^{A/B+}$ encontrado en el timo no era debido a una menor presencia de progenitores en el hígado fetal, sino a otros procesos que se discutirán en próximos apartados.

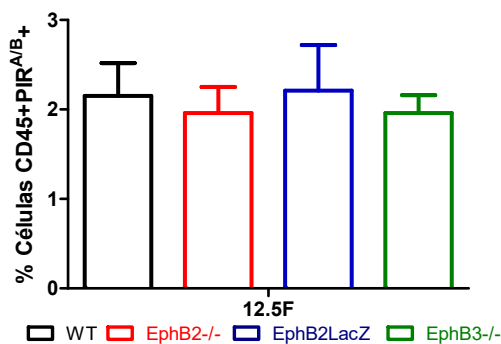


Figura 123. Proporción de células $CD45^+PIR^{A/B+}$ en el hígado de ratones de 12.5F WT y deficientes en EphB. La proporción de células progenitoras $CD45^+PIR^{A/B+}$ no disminuía en el hígado en ninguno de los animales deficientes en EphB en comparación a los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de los valores obtenidos a partir de, al menos, 5 fetos analizados.

Por otro lado, a pesar de que la proporción de progenitores linfoides era igual en los hígados fetales WT y mutantes quisimos determinar si la falta de EphB podría afectar a su celularidad total, haciendo que el número real de progenitores capaces de alcanzar el timo pudiera ser menor en los ratones deficientes. Por ello, analizamos también el número total de células $CD45^{+}PIR^{A/B+}$ que existían en los hígados WT y mutantes. Tal y como se muestra en la **Figura 124**, el número absoluto de células $CD45^{+}PIR^{A/B+}$ no estaba reducido en los hígados fetales mutantes con respecto a los WT, por lo que el número real de progenitores que son capaces de colonizar el timo no se ve reducido por la falta de las EphB.

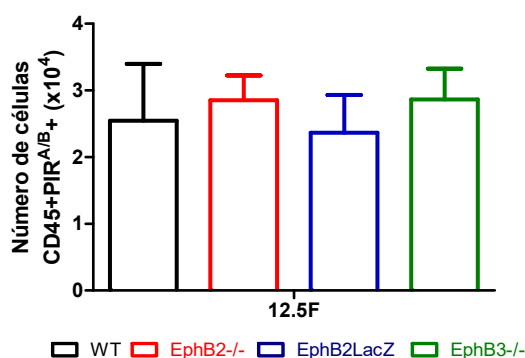


Figura 124. Número absoluto de células $CD45^{+}PIR^{A/B+}$ en el hígado fetal (12.5F) de ratones WT y deficientes en EphB. El número de células progenitoras $CD45^{+}PIR^{A/B+}$ en el hígado de los animales mutantes es similar al de los animales WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de los valores obtenidos a partir de, al menos, 5 fetos analizados.

Este menor porcentaje de progenitores linfoides podía contribuir, sin duda, a la caída de la celularidad tímica, pero en otros modelos experimentales donde también hay un déficit de progenitores que colonizan el timo, el sistema se recupera expandiendo la población de timocitos más tempranos del compartimento DN (*Krueger y cols., 2010*). Para estudiar si en nuestros mutantes ocurría algo semejante, aparte de evaluar el porcentaje de células linfoides en ciclo en todos estos estadios (ver luego), analizamos comparativamente la evolución de esta población celular entre 12.5F y 14.5F en timos mutantes y WT. La población DN es una población heterogénea de células cuyas subpoblaciones se definen en base a la expresión de los marcadores CD44 y CD25, dentro de las células que no expresan los distintos marcadores de linaje (Lin^{-} : CD3 ϵ , CD4, CD8, CD45R/B220, CD11b, Ly-76, Ly-6G y Ly-6C). Estas células además, tienen una expresión variable de c-kit (CD117), pudiéndose definir de este modo cuatro subpoblaciones de timocitos DN: DN1 (c-kit $^{+}$ CD44 $^{+}$ CD25 $^{-}$), DN2 (c-kit $^{+}$ CD44 $^{+}$ CD25 $^{+}$), DN3 (c-kit $^{-/lo}$ CD44 $^{-}$ CD25 $^{+}$) y DN4 (c-kit $^{-/lo}$ CD44 $^{-}$ CD25 $^{-}$) (*Ceredig y Rolink, 2002*).

Al analizar la aparición y evolución de estas subpoblaciones en el timo WT observábamos como a 12.5F la práctica totalidad de los timocitos eran DN1 (**Fig. 125, Tabla 1**), con unas pocas células DN2. A 13.5F, incrementaba la proporción de células DN2 en detrimento de la subpoblación DN1, aunque todavía era la mayoritaria, sin que aparecieran aún células DN3 ni DN4 (**Fig. 125 y Tabla 1**), las cuales lo hacían a 14.5F, en detrimento de las anteriormente mencionadas (**Fig. 125 y Tabla 1**).

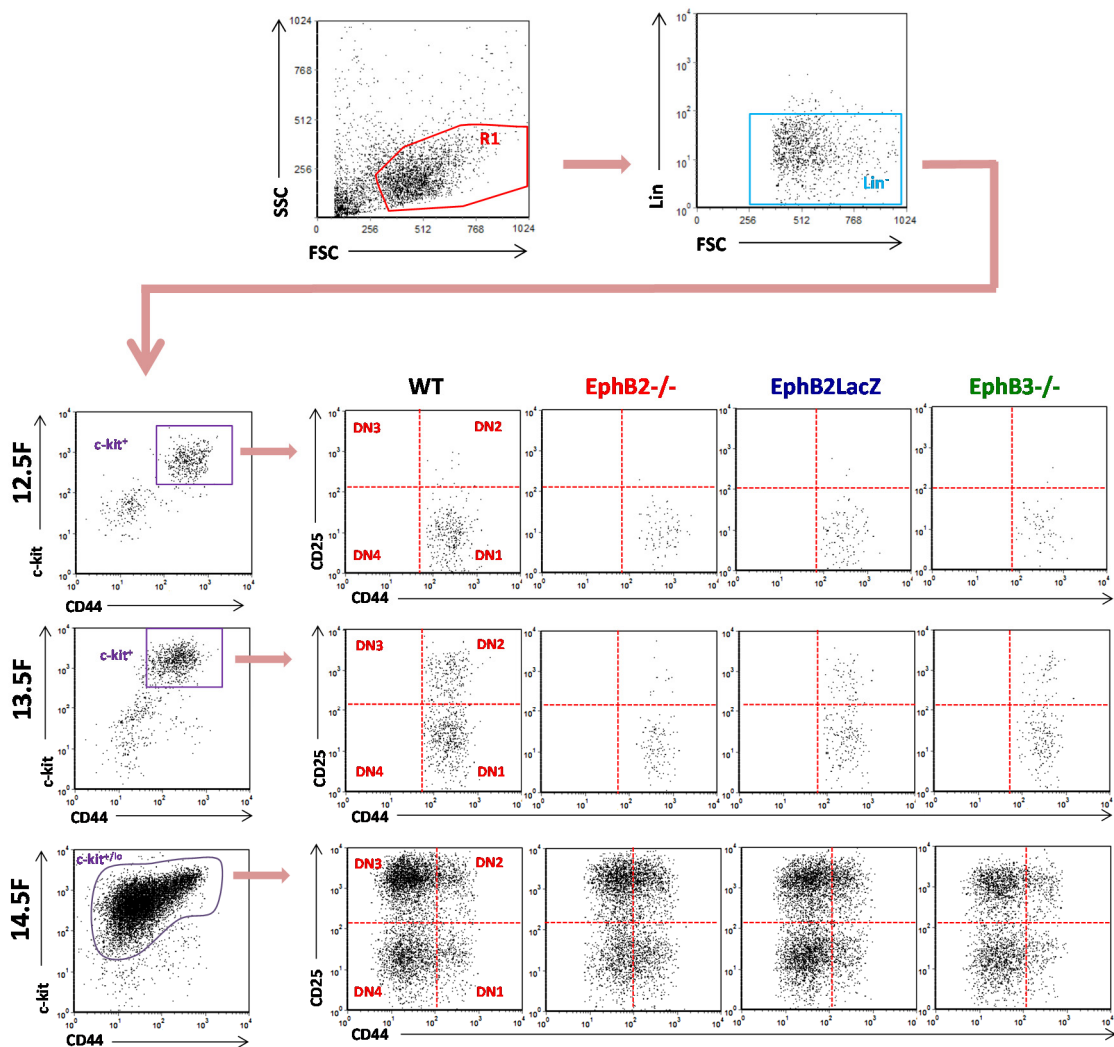


Figura 125. Análisis de los timocitos DN en el timo de ratones WT y deficientes en EphB entre 12.5F-14.5F. Inicialmente se delimitó la región R1 como la población tímica total en base al tamaño y complejidad (FSC-SSC) y posteriormente se seleccionaron en ella aquellas células que no expresaban los marcadores de linaje (Lin⁻: negativas para CD3ε, CD4, CD8, CD45R/B220, CD11b, Ly-76 (células eritroides) y Ly-6G y Ly-6C (granulocitos). Posteriormente los timocitos DN (DN1-DN4) fueron identificados por la expresión de CD44 y CD25 analizados dentro de la región acotada c-kit^{+/lo}CD44^{+/+}. Los *dot plots* son un ejemplo representativo de los valores analizados.

En todos los timos mutantes de 12.5F, había una acumulación significativa de células DN1 que cursaba con un retraso en la aparición de las células DN2 (**Tabla 1**). El retraso en la diferenciación también era evidente a 13.5F y 14.5F en todos los timos mutantes. En este último estadio, los timos EphB2^{-/-} mostraban un incremento significativo en la proporción de células DN1 y DN2 junto con una disminución en la proporción de células DN3 y DN4, con respecto a los valores WT (**Tabla 1**). En cambio, los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-} tenían porcentajes de células DN3 significativamente menores que los timos WT, pero debido a que tenían significativamente más células DN4, no viéndose afectado los valores para las células DN1 y DN2.

Porcentajes de células DN				
	% DN1	% DN2	% DN3	% DN4
12.5F				
WT	93,35 ± 2,53	6,65 ± 2,53	0 ± 0	0 ± 0
EphB2 ^{-/-}	98,33 ± 0,47**	1,68 ± 0,47**	0 ± 0	0 ± 0
EphB2LacZ	97,92 ± 0,94**	2,08 ± 0,94**	0 ± 0	0 ± 0
EphB3 ^{-/-}	98,04 ± 0,72**	1,97 ± 0,71**	0 ± 0	0 ± 0
13.5F				
WT	67,80 ± 4,50	31,99 ± 4,34	0 ± 0	0 ± 0
EphB2 ^{-/-}	83,82 ± 4,74***	16,18 ± 4,74***	0 ± 0	0 ± 0
EphB2LacZ	75,61 ± 2,44*	24,39 ± 2,44*	0 ± 0	0 ± 0
EphB3 ^{-/-}	74,62 ± 3,74*	25,39 ± 3,74*	0 ± 0	0 ± 0
14.5F				
WT	7,93 ± 0,90	11,49 ± 1,02	50,32 ± 2,81	30,99 ± 2,16
EphB2 ^{-/-}	13,16 ± 3,19*	19,96 ± 3,14***	44,08 ± 5,27*	22,79 ± 1,86***
EphB2LacZ	9,09 ± 2,50	10,80 ± 2,48	41,81 ± 3,80***	38,30 ± 2,04***
EphB3 ^{-/-}	9,16 ± 1,42	10,61 ± 1,62	42,90 ± 4,23**	37,21 ± 2,64***

Tabla 1. Porcentajes de células doble negativas (DN1-4) en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F-14.5F.

En la tabla se observa el porcentaje de cada una de las subpoblaciones de timocitos dobles negativos (DN1, DN2, DN3 y DN4) en timos WT, EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} entre 12.5F y 14.5F. Nótese la presencia sólo de DN1 y DN2 en los estadios de 12.5F y 13.5F, y la aparición de DN3 y DN4 a 14.5F tanto en los timos WT como mutantes. Además, se observa como éstos presentan a 12.5F y 13.5F un porcentaje significativamente mayor de DN1 y menor de DN2 al comparar con los WT. Sin embargo, a 14.5F aunque todos ellos presentan un porcentaje significativamente menor de DN3, los timos EphB2^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor de DN1 y DN2 y menor de DN4, y los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-} presentan porcentajes iguales de DN1 y DN2 que los timos WT, pero significativamente mayor de DN4. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Estos resultados muestran por tanto, que en los timos deficientes en EphB no sólo no se produce una recuperación total de las poblaciones DN como sucede en otros modelos experimentales, en que el número de progenitores que colonizan el timo son bajos, sino que hay un retraso en su maduración, particularmente en el caso de los timos EphB2^{-/-}. En los timos EphB2^{LacZ} y EphB3^{-/-} los valores son más parecidos a los WT, de manera que a 14.5F ya sólo muestran valores más bajos de las proporciones de DN3 y más altos de DN4, por el retraso en alcanzar el siguiente compartimento DP donde, de nuevo, estos timos deficientes muestran porcentajes más bajos que los de ratones WT (Alfaro y cols., 2008). Estos datos podrían afectar el desarrollo del epitelio tímico como después analizaremos.

2.1.1.2. Producción de quimiocinas en el primordio tímico temprano

WT y mutante

Los resultados descritos en el apartado anterior demostraban que el porcentaje de células progenitoras CD45⁺PIR^{A/B+} que colonizaban el timo de ratones fetales deficientes en EphB era significativamente menor que el observado en los timos WT, a pesar de que no había diferencias en las proporciones ni en los valores absolutos de dichos progenitores en el hígado fetal donde se generan. Parecía, por tanto, que el problema podría radicar en el propio proceso de la colonización, un proceso que ya habíamos demostrado *in vitro* utilizando FTOCs de 15.5F y progenitores adultos Lin⁻ de médula ósea, estaba alterado en ratones deficientes en EphB (Stimamiglio y cols., 2010; Alfaro y cols., 2015), independientemente de la evolución que ya dentro del timo sigan estas poblaciones (ver luego). Analizamos entonces, si podíamos establecer alguna correlación entre la menor proporción de progenitores linfoides tempranos tímicos y alteraciones en la producción de esas quimiocinas por las células epiteliales tímicas deficientes en EphB.

Para analizar la expresión en el primordio tímico fetal de las quimiocinas, llevamos a cabo un análisis morfométrico sobre secciones histológicas de fetos de 12.5F y 13.5F teñidas por inmunofluorescencia. Inicialmente, analizamos la expresión de las quimiocinas CCL21 y CCL25, que como hemos comentado intervienen en regular la colonización tímica de los progenitores linfoides. A 12.5F la expresión de CCL21 dentro

del complejo común timo-paratiroides WT (**Fig. 126**) se identificaba, al igual que han descrito otros autores (*Liu y cols., 2005; Jenkinson y cols., 2007*), en la región comprometida con el paratiroides y no en la región que evolucionará a timo. A 13.5F, la expresión de CCL21 fue muy escasa en el primordio tímico (**Fig. 127**), estando ausente en muchas de las secciones analizadas y en las que había, se localizaba en pequeños grupos próximos a la cápsula del órgano, algo también descrito por otros autores (*Liu y cols., 2006*).

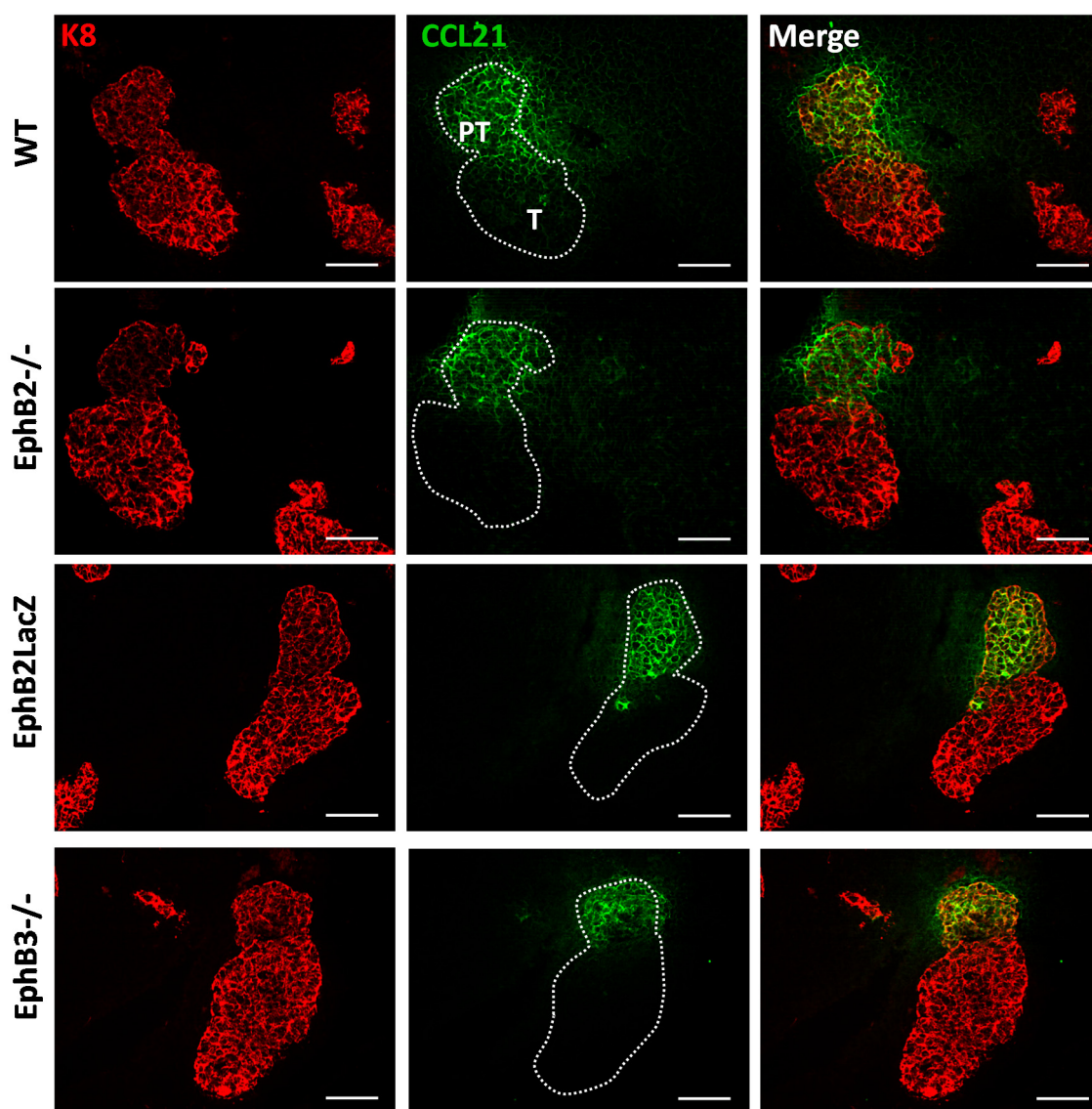


Figura 126. Expresión de la quimiocina CCL21 en el complejo común timo-paratiroides de 12.5F de ratones WT y deficientes en EphB. El complejo timo-paratiroides fue identificado en base a la expresión de K8 (rojo). Las imágenes muestran como a 12.5F la expresión de CCL21 (verde) está restringida a la región determinada a paratiroides (PT) y no a timo (T) tanto en animales WT como en mutantes para EphB. La línea de puntos delimita el complejo timo-paratiroides. Nótese la colocalización de la expresión de CCL21 con K8 (amarillo, *Merge*) Escala: 50µm.

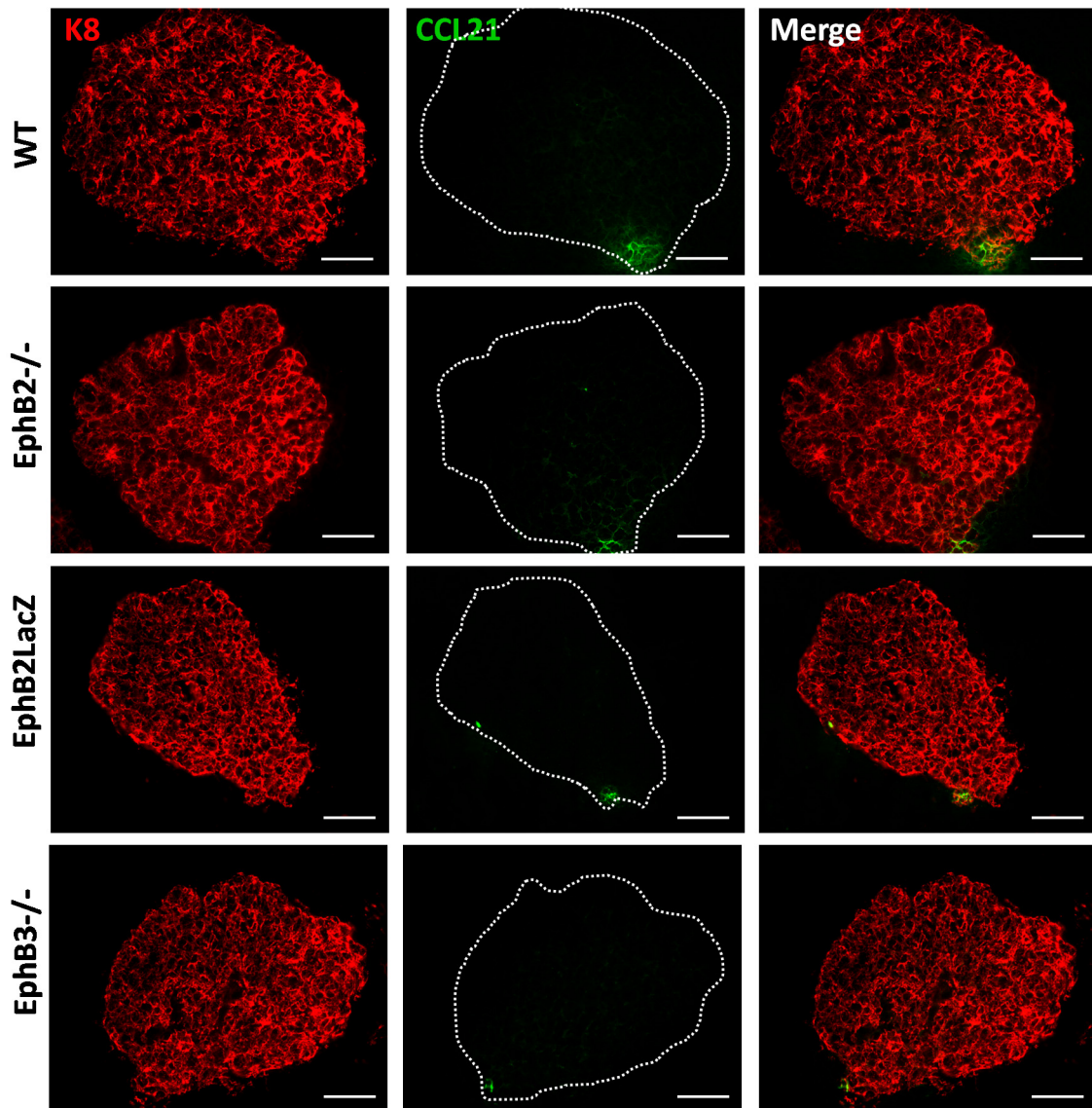


Figura 127. Expresión de la quimiocina CCL21 en el primordio tímico de 13.5F de ratones WT y deficientes en EphB. Las imágenes muestran como a 13.5F la expresión de CCL21 (verde) es muy escasa y está localizada en las regiones periféricas del lóbulo tímico, delimitado por la línea de puntos, tanto en el timo WT como en los deficientes en EphB. Escala: 50µm.

Al analizar la expresión de CCL25 en los timos 12.5F WT (**Fig. 128**), observábamos que a diferencia de CCL21, esta quimiocina se expresaba en todo el complejo timo-paratiroides y a 13.5F (**Fig. 129**) por todo el primordio tímico, como han descrito otros autores (*Liu y cols., 2005; Jenkinson y cols., 2007*), aunque la expresión era más intensa en las regiones centrales del primordio.

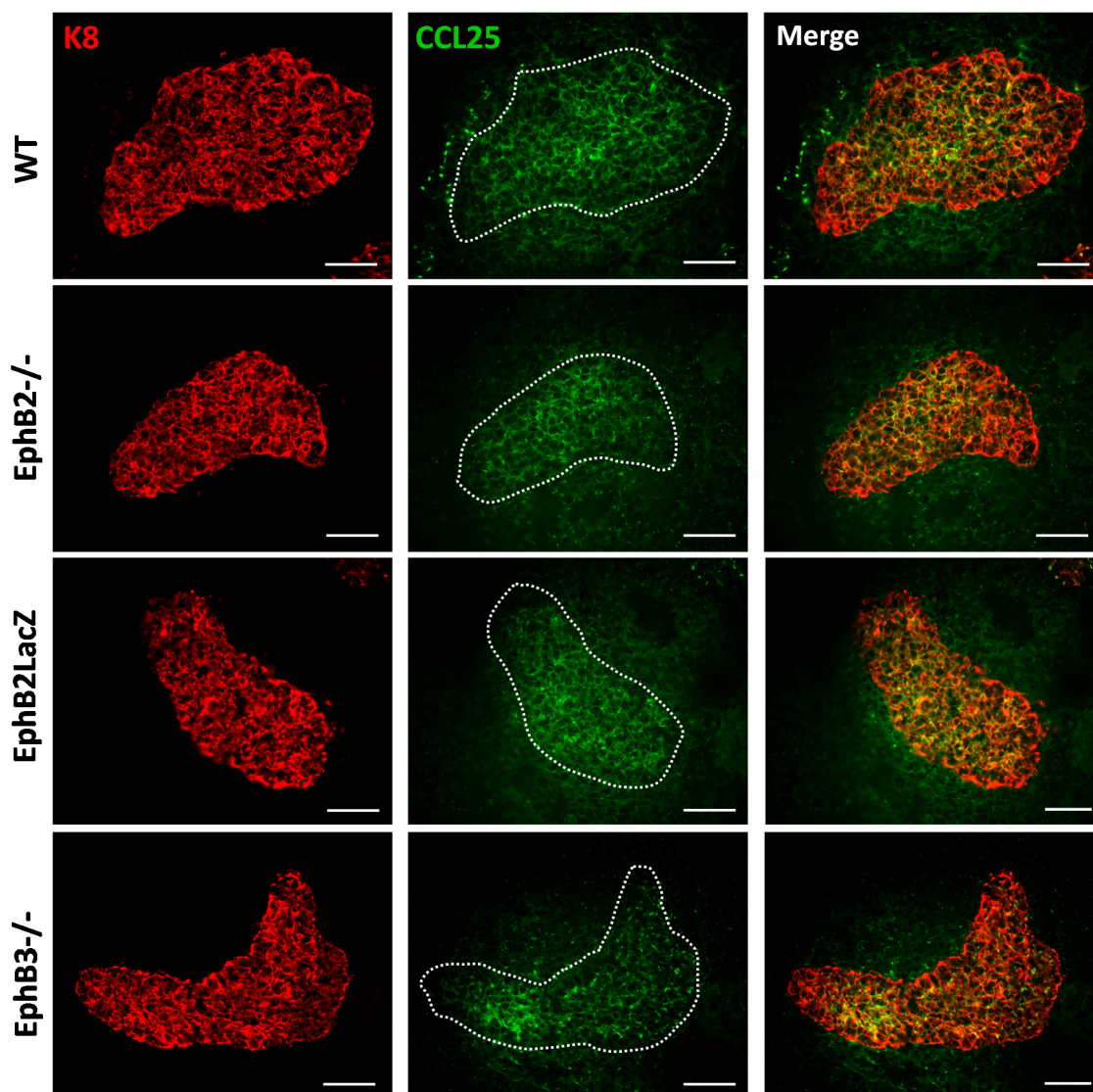


Figura 128. Expresión de la quimiocina CCL25 en el complejo timo-paratiroides de ratones WT y deficientes en EphB de 12.5F. El complejo timo-paratiroides fue identificado en base a la expresión de K8 (rojo) que no permite diferenciar, sin embargo, las dos regiones. A 12.5F la expresión de CCL25 (verde) ocurre por todo el complejo timo-paratiroides (línea de puntos), colocalizando con células K8⁺ (amarillo, *Merge*), fundamentalmente en las regiones centrales de este complejo. Escala: 50µm.

Cuando analizábamos la expresión de ambas quimiocinas en los timos deficientes en EphB comprobamos que la expresión tanto de CCL21 (**Fig. 126, 127**) como de CCL25 (**Fig. 128, 129**) aparecía en las mismas regiones que en los timos WT tanto a 12.5F como a 13.5F, pero el análisis morfométrico mostraba como su expresión en los timos mutantes respecto a la observada en los WT, era significativamente menor tanto en el complejo timo-paratiroides a 12.5F (**Fig. 130, 131**) como en el primordio tímico a 13.5F (**Fig. 130, 131**) observándose en este último estadio una expresión de CCL25 significativamente mayor en los timos EphB2^{-/-} en comparación con el resto de

mutantes (Fig. 131).

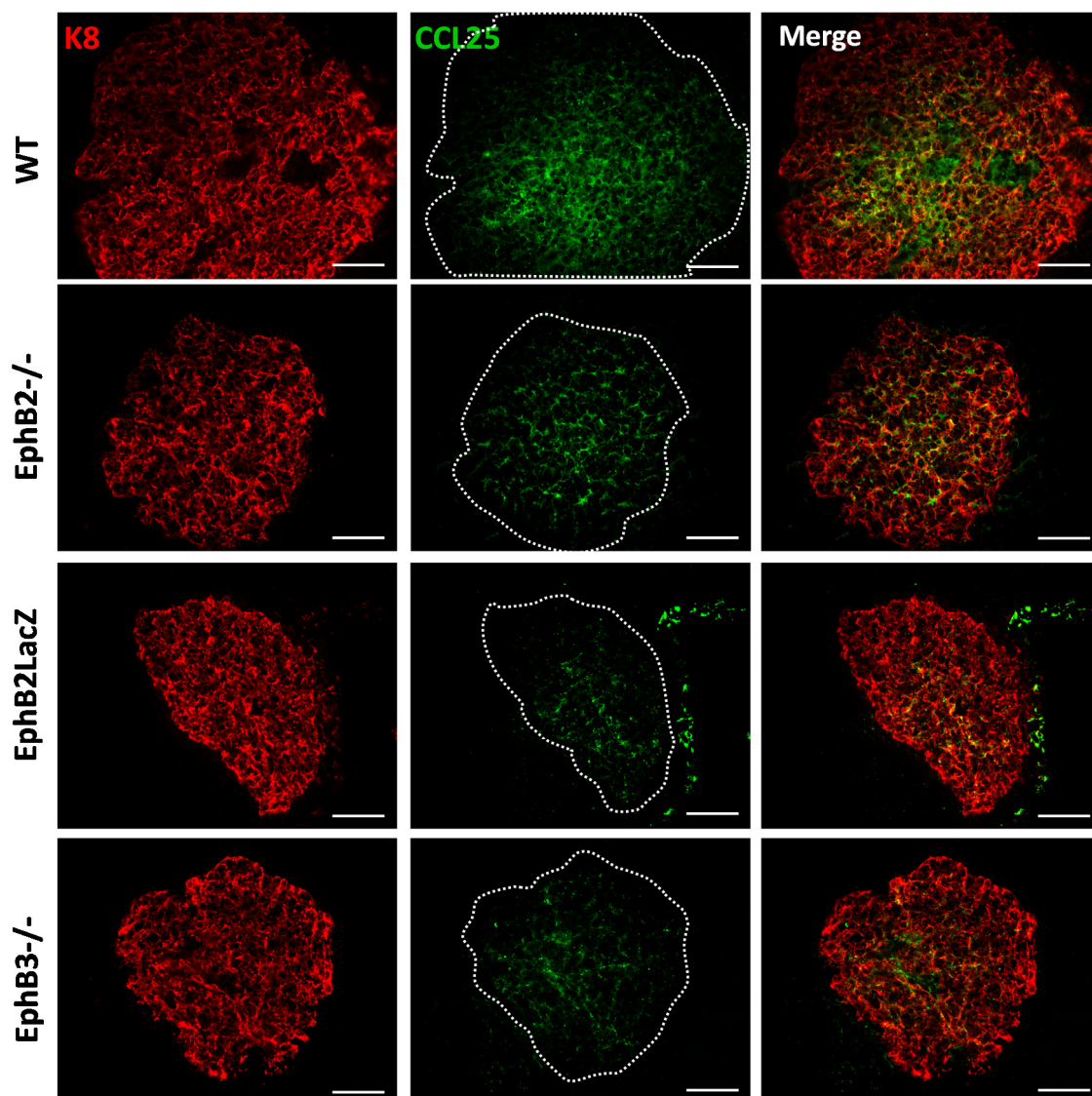


Figura 129. Expresión de la quimiocina CCL25 en el primordio tímico de 13.5F de ratones WT y deficientes en EphB. A 13.5F tanto en el timo WT como en los deficientes en EphB la expresión de CCL25 (verde) aparece por todo el primordio tímico (K8⁺ y línea de puntos), siendo más intensa en las regiones centrales. Escala: 50µm.

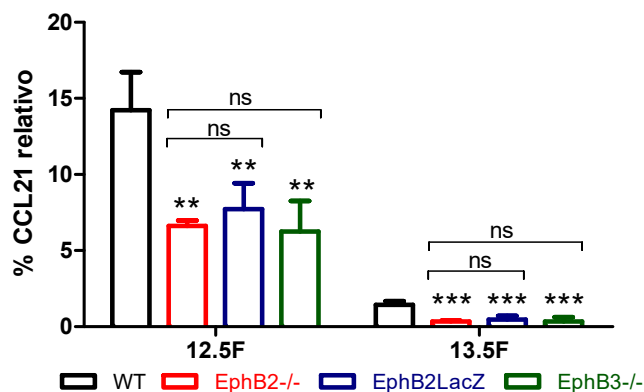


Figura 130. Análisis cuantitativo de la expresión de CCL21 respecto al tamaño del complejo timo-paratiroides a 12.5F y del timo a 13.5F en animales WT y mutantes en EphB. La expresión de CCL21 es significativamente menor en los mutantes respecto a los WT, tanto a 12.5F como a 13.5F. No se observan diferencias al comparar los valores mutantes entre sí. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 4 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

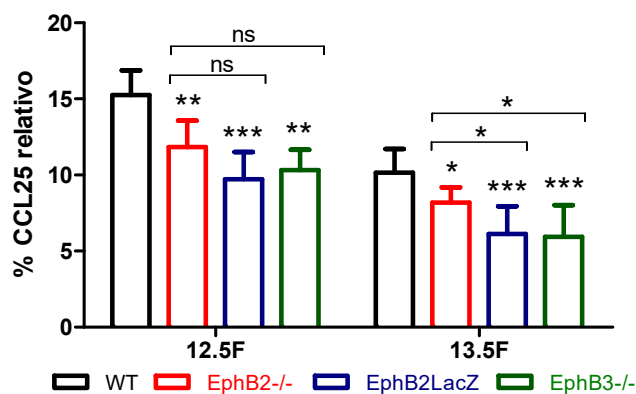


Figura 131. Análisis cuantitativo de la expresión de CCL25 respecto al tamaño del complejo timo-paratiroides a 12.5F y del timo a 13.5F en animales WT y mutantes en EphB. La expresión de CCL25 es significativamente menor en los mutantes a 12.5F y 13.5F respecto a los valores WT. No se observan diferencias al comparar los valores mutantes entre sí a 12.5F pero sí a 13.5F, cuando los timos EphB2^{-/-} muestran una expresión significativamente mayor que el resto de mutantes analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 4 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Por último, analizamos la expresión de la quimiocina CXCL12 en los timos WT aunque, como hemos comentado, su participación en el reclutamiento de los progenitores linfoides durante el desarrollo es cuestionada, claramente participa en su migración dentro del timo una vez que han colonizado el órgano. A 12.5F la expresión de CXCL12 (**Fig. 132**) aparecía distribuida por el complejo timo-paratiroides tal y como han descrito otros autores (*Jenkinson y cols., 2007*). Su expresión parecía más débil que la de CCL21 y CCL25, salvo en algunas células centrales. A 13.5F (**Fig. 133**), la expresión se concentraba más claramente en las regiones centrales del parénquima. Cuando comparamos la expresión de CXCL12 en los timos mutantes con la existente en los timos WT, no observábamos diferencias evidentes en los patrones o en la intensidad

de expresión tanto a 12.5F (**Fig. 132**) como a 13.5F (**Fig. 133**), pero el estudio cuantitativo demostró una expresión ligeramente menor en los timos deficientes en EphB2 y EphB2LacZ (**Fig. 134**) de 12.5F comparados con los valores WT aunque no significativa. Sin embargo, a 13.5F todos los mutantes mostraron una reducción significativa en la expresión de CXCL12 (**Fig. 134**), sin diferencias significativas al comparar entre ellos.

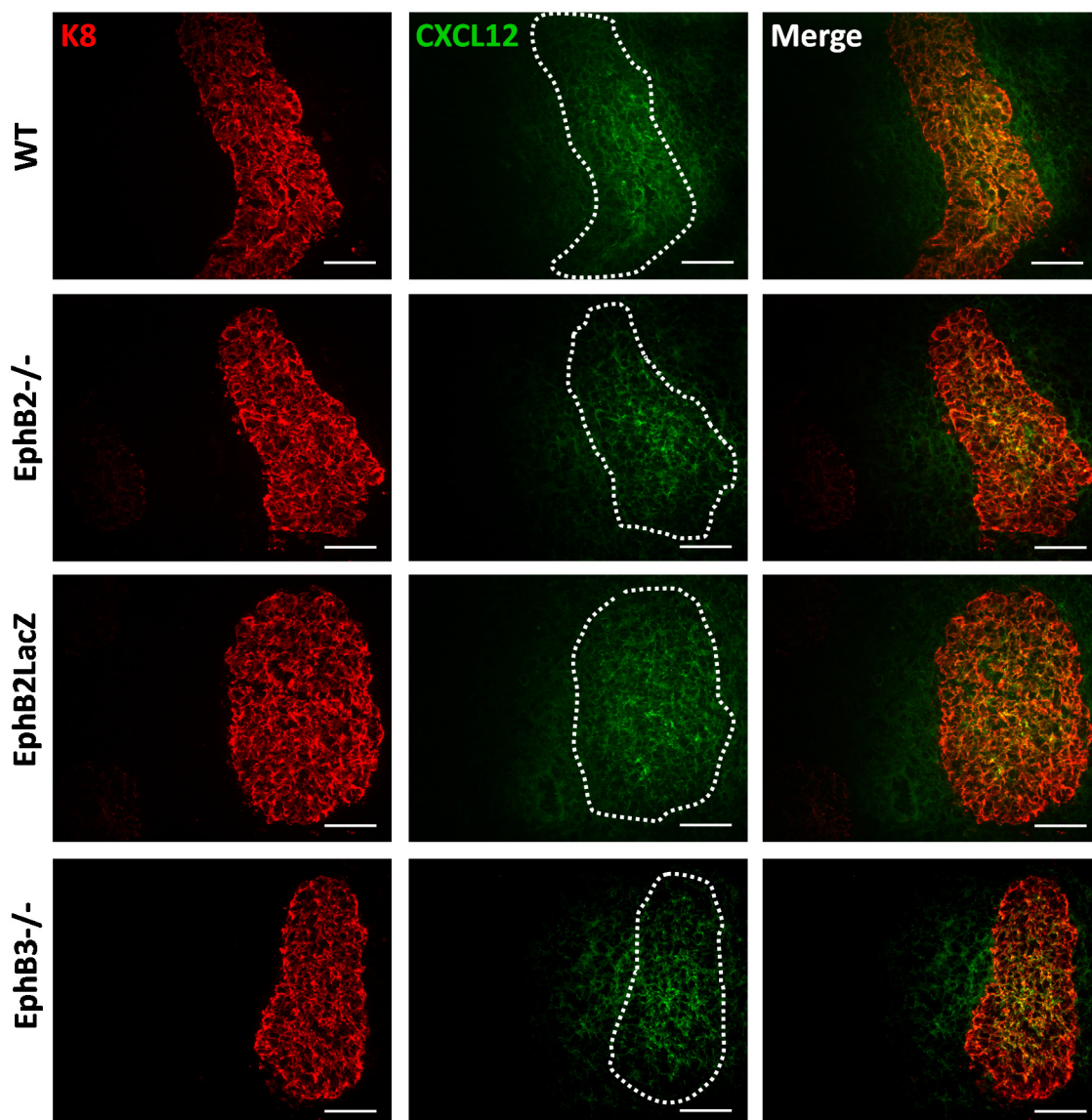


Figura 132. Expresión de la quimiocina CXCL12 en el complejo timo-paratiroides de 12.5F de ratones WT y deficientes en EphB. El complejo timo-paratiroides fue identificado en base a la expresión de K8 (rojo). A 12.5F tanto en los ratones WT como en los mutantes la expresión de CXCL12 (verde) se localiza por todo el complejo timo-paratiroides (línea de puntos), con mayor intensidad en las regiones más internas. La combinación de ambos marcadores se muestra en *Merge*. Escala: 50µm.

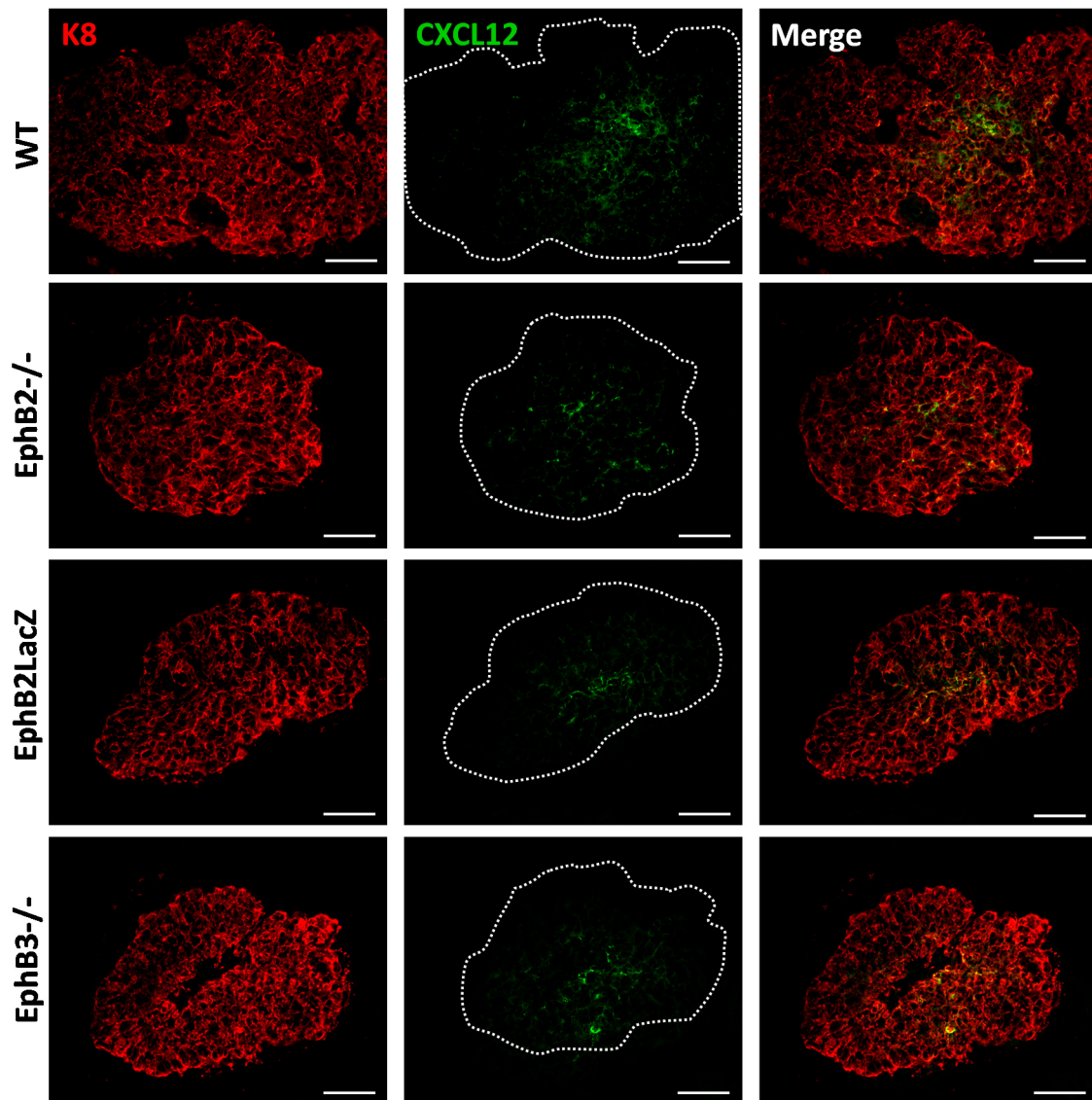


Figura 133. Expresión de la quimiocina CXCL12 en el timo de 13.5F de ratones WT y deficientes en EphB. El primordio tímico fue identificado en base a la expresión de K8 (rojo). A 13.5F la expresión de CXCL12 (verde) es más evidente en las regiones centrales del lóbulo tímico (línea de puntos) donde el marcaje muestra mayor intensidad. El marcaje combinado se muestra en *Merge*. Escala: 50µm.

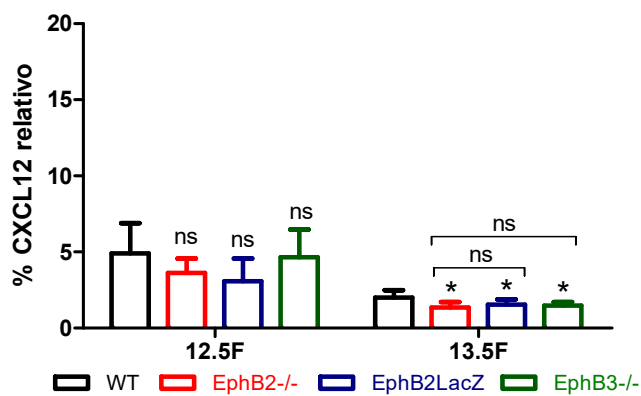


Figura 134. Análisis cuantitativo de la expresión de CXCL12 respecto al tamaño del complejo timo-paratiroides a 12.5F y del timo a 13.5F en animales WT y mutantes en EphB. A diferencia de las otras dos quimiocinas estudiadas (CCL21 y CCL25), no se observan diferencias en la expresión de CXCL12 entre los timos WT y mutantes a 12.5F, pero sí a 13.5F, donde estos últimos muestran una expresión significativamente menor, sin que existan diferencias entre los valores mutantes entre sí. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 4 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

2.1.1.3. Muerte en la población linfoide en los primeros estadios del desarrollo tímico

Con el fin de estudiar otras causas que pudieran contribuir a la menor proporción de progenitores linfoides ($CD45^+PIR^{A/B+}$) y de timocitos $CD45^+$, aparte del efecto de la menor colonización linfoide en los timos mutantes, determinamos la proporción de células $CD45^+$ apoptóticas en los estadios más tempranos del desarrollo (12.5F y 13.5F) y no en sucesivos, pues resultados previos de nuestro grupo (*Alfaro y cols., 2008*) ya habían confirmado que los timocitos deficientes en EphB2 y/o EphB3 a partir de 15.5F tenían tasas de supervivencia menores.

Para ello, inicialmente determinamos la proporción de células $CD45^+$ apoptóticas mediante el empleo de AnexinaV en combinación con la del intercalante de ADN, 7-amino-actinomicina-D (7-AAD) (**Fig. 135**). La AnexinaV reconoce el fosfolípido de membrana fosfatidilserina que es translocado desde la cara citoplásmica de la membrana celular a la superficie en células en proceso de apoptosis. Por otro lado, 7-AAD tiene la capacidad de unirse al ADN cuando existen roturas en la membrana plasmática de las células, proceso que sucede en estadios más avanzados de la apoptosis. De este modo, las células viables pueden ser definidas como AnexinaV⁻7AAD⁻, las células apoptóticas como AnexinaV⁺7AAD⁻ y las células muertas como AnexinaV⁺7AAD⁺.

Los resultados obtenidos a 12.5F indicaban que la proporción de células apoptóticas WT $CD45^+$ era muy baja (**Fig. 136**), si la comparábamos con la proporción de estas células en la población epitelial total (EpCAM⁺CD45⁻) en este estadio (ver más adelante **Fig. 141**), donde el predominio celular corresponde a la fracción epitelial. Sin embargo, el porcentaje de células $CD45^+$ apoptóticas incrementaba a 13.5F (**Fig. 136**) al contrario de lo que sucedía con las TECs (ver más adelante **Fig. 141**).

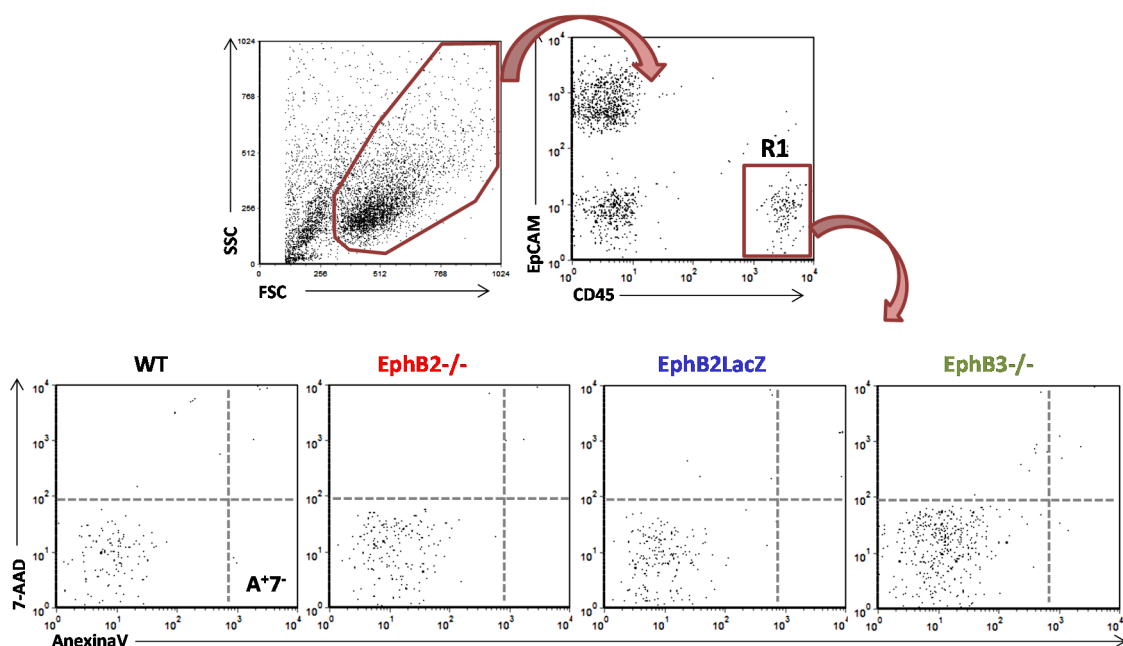


Figura 135. Identificación de la población linfoides apoptótica en timos WT y deficientes en EphB. Se delimitó la población tímica total en base a tamaño y complejidad (FSC-SSC) y a partir de ella se identificó la población linfoides en base a la expresión de los marcadores EpCAM y CD45 (EpCAM⁺CD45⁺, R1). A partir de esta población, se analizó la expresión de 7-amino-actinomicina-D (7-AAD) y AnexinaV, definiéndose las células apoptóticas como células AnexinaV⁺7-AAD⁺ (A⁺7). Nótese la baja proporción de células apoptóticas dentro de la población linfoides. Los *dot plots* son un ejemplo representativo de los valores totales analizados a 12.5F.

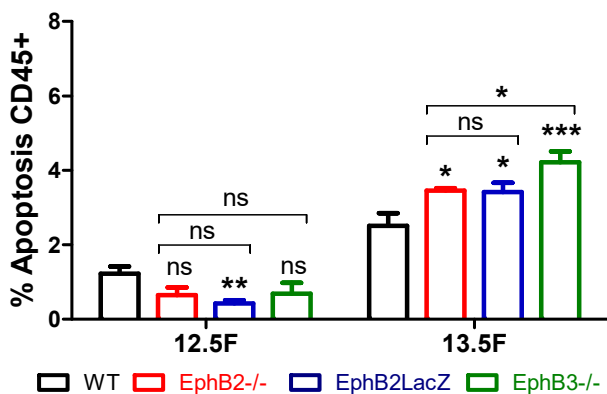


Figura 136. Porcentaje de células apoptóticas en la población linfoides CD45⁺ en timos WT y deficientes en EphB a 12.5F y 13.5F. A 12.5F los timos deficientes en EphB tienen un porcentaje menor de células apoptóticas CD45⁺ que los timos WT, siendo significativas las diferencias sólo en el caso de los EphB2LacZ, y sin observar diferencias entre los timos mutantes. Sin embargo, a 13.5F todos muestran un porcentaje de células CD45⁺ apoptóticas significativamente mayor, siendo las células EphB3^{-/-} las que tienen valores mayores, incluso respecto a los de EphB2^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

También en los timos mutantes, la proporción de células linfoides apoptóticas era muy baja a 12.5F, incluso significativamente menor que en los WT en el caso de los timos EphB2LacZ (**Fig. 136**). Por el contrario, a 13.5F los timos mutantes tenían una proporción significativamente mayor que los WT de células CD45⁺ apoptóticas (**Fig. 136**). Este incremento era, además, significativamente mayor en timos EphB3^{-/-} que

en EphB2^{-/-}, sin que hubiera por otro lado diferencias entre los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ.

Estos resultados demostraban por un lado que la menor proporción de células CD45⁺ observada en los timos mutantes a 12.5F no era consecuencia de una mayor muerte de estas células, por lo que otras causas como las previamente indicadas al comienzo de este apartado y en posteriores deben de estar explicando esta característica. Sin embargo, a 13.5F ya existe un incremento en la proporción de timocitos apoptóticos, que contribuiría a explicar el menor número de estas células en este estadio y en posteriores. Por otro lado, estos resultados refuerzan nuestros datos sobre la muerte linfóide en los timos mutantes de 15.5F, donde ya observábamos un incremento de timocitos apoptóticos que se mantenía en estadios fetales tardíos (17.5F) y posnatales (2PN), así como en el timo adulto (Alfaro y cols., 2008).

Evaluamos el número de células apoptóticas en cada condición habida cuenta de que los números de células totales variaban considerablemente entre timos WT y mutantes y, a fin de valorar la contribución real de este parámetro para la hipocelularidad del órgano. Entre 12.5F y 13.5F, el número de células CD45⁺ apoptóticas en los timos WT incrementaba, correlacionándose con el aumento en el porcentaje de células apoptóticas (**Tabla 2**). En los timos de animales deficientes en EphB también había aumento, pero en términos absolutos mostraron una reducción significativa en el número de timocitos apoptóticos a 12.5F, pero no a 13.5F, aunque en este último caso los valores eran ligeramente menores (**Tabla 2**).

	Número Absoluto de células CD45 ⁺ apoptóticas	
	12.5F	13.5F
WT	23 ± 9	126 ± 14
EphB2 ^{-/-}	5 ± 1*	85 ± 32
EphB2LacZ	5 ± 1*	88 ± 26
EphB3 ^{-/-}	10 ± 3*	110 ± 43

Tabla 2. Número absoluto de células CD45⁺ apoptóticas en timos WT y deficientes en EphB de 12.5F y 13.5F. Los timos mutantes muestran un número significativamente menor de células CD45⁺ a 12.5F pero no a 13.5F. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la t de Student.

2.1.1.4. Ciclo de la población linfoide durante el desarrollo tímico fetal

Utilizamos citometría de flujo y tinción con Hoechst 33342 para determinar, entre 12.5F-17.5F, la proporción de células linfoides $\text{EpCAM}^- \text{CD45}^+$ (CD45^+) en ciclo, tanto en timos WT como deficientes en EphB. El análisis citométrico seguido para este estudio se muestra en la **Figura 137**. La proporción de las células en ciclo se determinó calculando el porcentaje de células que se encontraban en la fase $\text{S}+\text{G}_2/\text{M}$ del ciclo celular (**Fig. 137**).

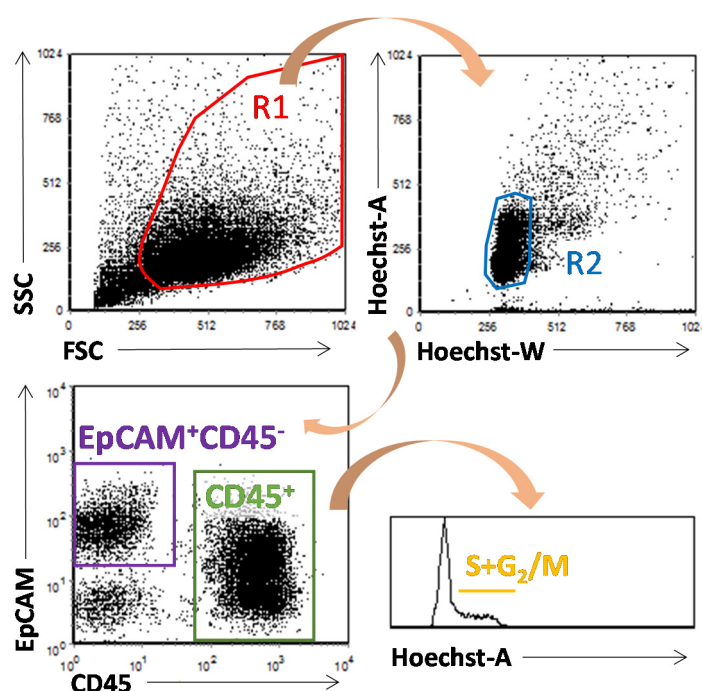


Figura 137. Identificación de la proporción de células tímicas $\text{EpCAM}^- \text{CD45}^+$ (CD45^+) y $\text{EpCAM}^+ \text{CD45}^-$ en ciclo entre 12.5F-17.5F. Se delimitó la región R1 como la población tímica total en base a su tamaño y complejidad (FSC-SSC). Los dobletes celulares fueron descartados analizando dentro de la población R1 los parámetros para Hoechst de área (A) y anchura (W) (R2). Dentro de R2 y, en base a la expresión de los marcadores EpCAM y CD45, se identificó la población linfóide CD45^+ ($\text{EpCAM}^- \text{CD45}^+$) o epitelial ($\text{EpCAM}^+ \text{CD45}^-$), en cada una de las cuales se determinó la proporción de células en ciclo ($\text{S}+\text{G}_2/\text{M}$). Los dot plots son representativos de los fetos analizados.

Los resultados obtenidos revelan que la proporción de células CD45^+ WT en ciclo (**Fig. 138**) era prácticamente constante en los distintos estadios fetales analizados (12.5F-17.5F), con un 35-40% de células en ciclo. Cuando analizamos las células mutantes en ciclo, observábamos que el patrón de proliferación experimentado por éstas era similar al de las células WT, pero en todos los estadios presentaban valores significativamente más bajos (**Fig. 138**).

Estos resultados demostrarían que la menor proporción de células CD45^+ mutantes en ciclo estaría contribuyendo al menor porcentaje de células CD45^+ que ya hemos descrito desde 12.5F y hasta 17.5F en los timos mutantes.

Cuando comparamos los valores de células linfoides en ciclo entre los timos mutantes no se encontraron diferencias entre EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} a lo largo del desarrollo, con la excepción de un mayor descenso a 13.5F en timos EphB3^{-/-} que en EphB2^{-/-} (**Fig. 138**) y a 17.5F donde los timos EphB2^{-/-} mostraban una proporción mayor de células en ciclo que los EphB2LacZ y menor que los EphB3^{-/-} (**Fig. 138**).

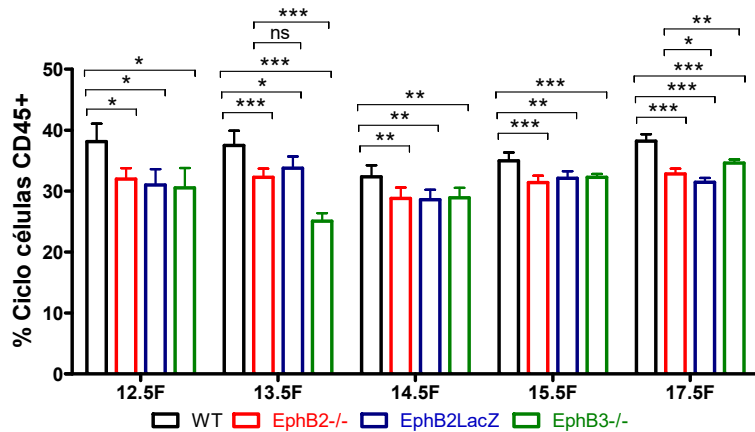


Figura 138. Proporción de células linfoides CD45⁺ en ciclo en los timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. La gráfica muestra como los timos deficientes en EphB tienen un porcentaje significativamente menor de células CD45⁺ en ciclo con respecto a los timos WT, en todos los estadios estudiados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Cuando analizamos los valores absolutos de células linfoides (**Tabla 3**), el número en los timos WT aumentaba a lo largo del desarrollo, multiplicándose por diez entre estadios a partir de 13.5F. En los timos mutantes, el incremento del número total de células CD45⁺ era también evidente, sin embargo, en todos ellos había una reducción significativa del mismo desde 13.5F y hasta 17.5F. A 12.5F, no había diferencias en el número de células en ciclo. Por otro lado, hay que destacar que la expansión de diez veces en el número de células en ciclo en los timos WT entre estadio no se observaba en los timos mutantes, siendo mucho menor en algunos estadios.

	Número Absoluto de células CD45 ⁺ en ciclo				
	12.5F	13.5F	14.5F	15.5F	17.5F (x10 ⁶)
WT	343 ± 27	1571 ± 291	16531 ± 2073	121206 ± 4536	1,01 ± 0,19
EphB2 ^{-/-}	306 ± 39	1083 ± 184*	6271 ± 938***	31603 ± 2782***	0,32 ± 0,05***
EphB2LacZ	340 ± 5	886 ± 79*	11690 ± 734***	58514 ± 6083***	0,59 ± 0,16***
EphB3 ^{-/-}	324 ± 28	1143 ± 165*	8604 ± 1969***	34214 ± 4310***	0,51 ± 0,09***

Tabla 3. Número absoluto de células CD45⁺ en ciclo en timos WT y deficientes en EphB de 12.5F a 17.5F. Los timos mutantes muestran un número significativamente menor de células CD45⁺ en ciclo en todos los estadios analizados excepto a 12.5F. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Cuando comparamos entre timos mutantes el número absoluto de células CD45⁺ en ciclo comprobamos que los EphB2^{-/-} tenían un número significativamente menor que los EphB2LacZ desde 14.5F (**Fig. 139A**), lo que demuestra de nuevo la relevancia de la señalización *forward* respecto de la *reverse*. Por otro lado, los timos EphB2^{-/-} mostraban también un número significativamente menor de células en ciclo al comparar con los EphB3^{-/-} a 14.5F y 17.5F, pero no a 15.5F (**Fig. 139B**). En realidad, las diferencias en el número de timocitos en ciclo eran mayores entre timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ que entre EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}.

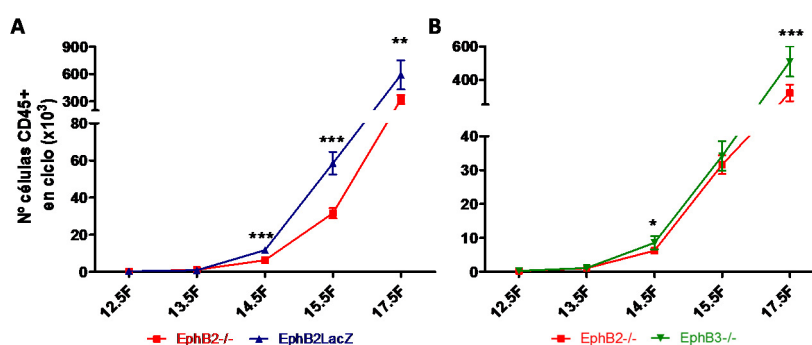


Figura 139. Análisis comparado del número absoluto de células CD45⁺ en ciclo entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Los timos EphB2^{-/-} muestran una reducción significativa en el número de células CD45⁺ en ciclo entre 14.5F y 17.5F respecto a los valores EphB2LacZ (**A**) y EphB3^{-/-}, excepto a 15.5F en este último caso (**B**). Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos por cada estadio. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

2.1.2. Papel de las células epiteliales tímicas

Para intentar explicar las alteraciones observadas en el compartimento epitelial estudiamos, al igual que en el caso de los timocitos, la supervivencia y proliferación de las TECs mutantes y WT.

2.1.2.1. Muerte de las TECs en los primeros estadios del desarrollo tímico

Nuestro grupo había analizado previamente la muerte de las TECs en timos WT y mutantes (EphB2^{-/-} y/o EphB3^{-/-}) desde 13.5F a neonatal, observando que estas células tenían tasas de supervivencia menores desde 13.5F que afectaban a la población epitelial total (*García-Ceca y cols., 2013*). Sin embargo, al igual que en el caso de la población linfóide, desconocíamos la situación en estadios más tempranos. Por ello, analizamos a 12.5F la tasa de apoptosis de las TECs (EpCAM⁺CD45⁻) que representan principalmente la subpoblación MTS20⁺, pero volvimos también a analizar la de 13.5F, ya que en los trabajos previos no habíamos analizado la muerte en timos EphB2LacZ. La estrategia seguida para este análisis se muestra en la **Figura 140**.

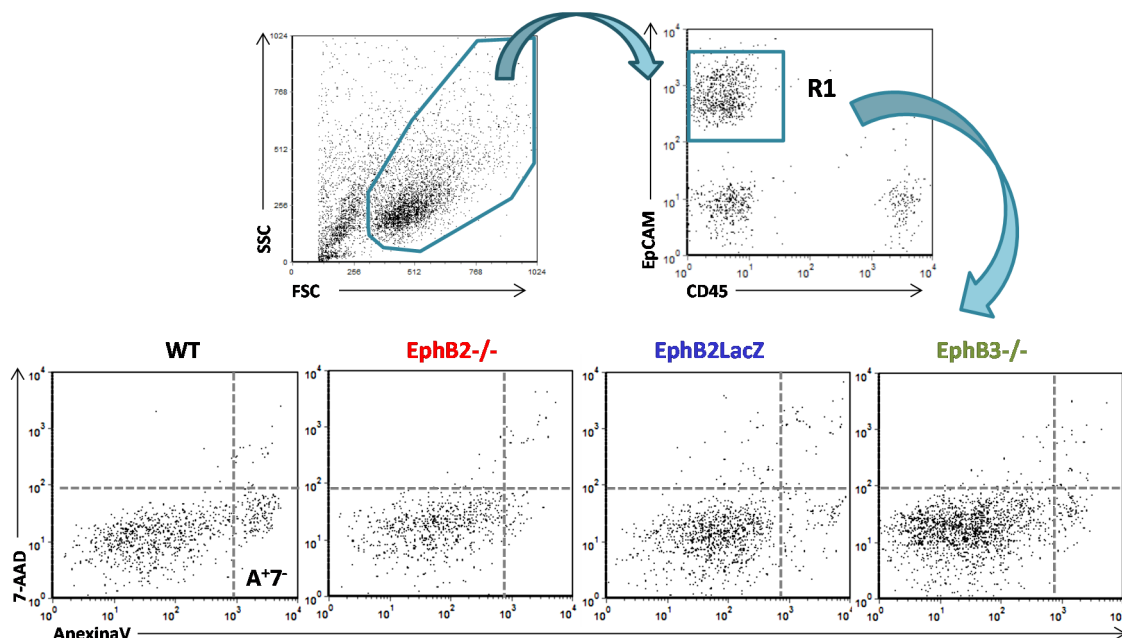


Figura 140. Identificación de la población epitelial apoptótica en los timos WT y deficientes en EphB. Se delimitó la población tímica total en base a su tamaño y complejidad (FSC-SSC), a partir de ella se identificó la población epitelial en base a la expresión de los marcadores EpCAM y CD45 (EpCAM⁺CD45⁻; R1). A partir de esta población, se analizaron las células apoptóticas en base a la interacción con 7-amino-actinomicina-D (7-AAD) y a la tinción con AnexinaV, definiéndose como células AnexinaV⁺7-AAD⁻ (A⁺7⁻). Nótese la mayor proporción de células apoptóticas dentro de la población epitelial en comparación con la de la población linfóide (**Fig. 135**). Los *dot plots* son un ejemplo representativo de los valores totales analizados a 12.5F.

Nuestros resultados revelaban como entre 12.5F y 13.5F la proporción de células epiteliales apoptóticas WT (**Fig. 141**) era mayor que el observado dentro de la población linfóide CD45⁺ descritas en el apartado anterior (**Fig. 136**). Sin embargo, a diferencia de lo sucedido con estas últimas, la proporción de TECs apoptóticas descendía entre 12.5F-13.5F en los timos WT pero no en los mutantes, de manera que el porcentaje de TECs apoptóticas era significativamente más bajo en los tres mutantes a 12.5F (**Fig. 141**) mientras que a 13.5F la proporción era significativamente mayor en todos ellos (**Fig. 141**), sin diferencias al comparar entre sí los valores mutantes.

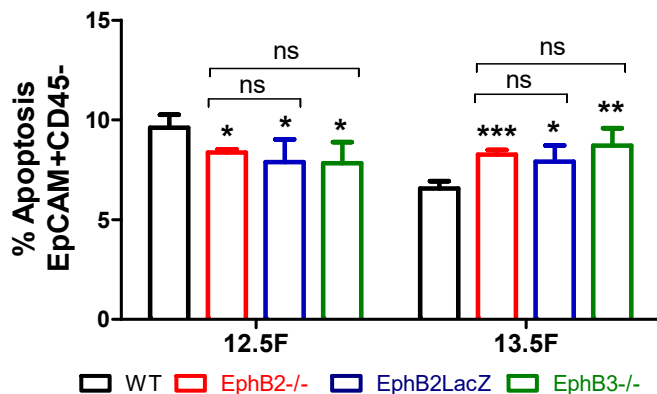


Figura 141. Porcentaje de células apoptóticas en la población epitelial EpCAM⁺CD45⁻ en timos WT y deficientes en EphB a 12.5F y 13.5F. La gráfica muestra como el porcentaje de TEC apoptóticas WT disminuye entre 12.5F y 13.5F, mientras que en los mutantes es prácticamente igual. A 12.5F, las TECs mutantes tienen valores apoptóticos significativamente menores que los timos WT pero mayores a 13.5F. No se observan diferencias entre mutantes en ninguno de los dos estadios analizados. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Estos resultados reflejan que el incremento en la muerte epitelial observado en trabajos previos a 13.5F, comienza en ese estadio tanto en timos deficientes en EphB2 o EphB3 como en los timos EphB2LacZ, pero no antes (12.5F), donde el epitelio mutante tiene una tasa de supervivencia mayor que la WT.

En términos absolutos, las TEC WT apoptóticas disminuían entre 12.5F y 13.5F, mientras que las mutantes aumentaban ligeramente (más en el caso de EphB3^{-/-}). Cuando se comparaban unos y otros valores, todos los mutantes mostraban menor número de células apoptóticas a 12.5F, pero sólo los timos EphB2^{-/-} a 13.5F (**Tabla 4**).

	Número Absoluto de células EpCAM ⁺ CD45 ⁻ apoptóticas	
	12.5F	13.5F
WT	680 ± 47	446 ± 63
EphB2 ^{-/-}	231 ± 8**	270 ± 60*
EphB2LacZ	482 ± 36*	482 ± 45
EphB3 ^{-/-}	390 ± 5**	587 ± 41

Tabla 4. Número absoluto de células EpCAM⁺CD45⁻ apoptóticas en timos WT y deficientes en EphB de 12.5F y 13.5F. Los timos mutantes muestran un número significativamente menor de células EpCAM⁺CD45⁻ apoptóticas a 12.5F y únicamente a 13.5F en el caso de los timos EphB2^{-/-}. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ según el análisis estadístico de la t de Student.

2.1.2.2. Ciclo de las TECs durante el desarrollo tímico fetal

Determinamos también el ciclo de la población epitelial total (EpCAM⁺CD45⁻) identificada como antes indicábamos para los timocitos CD45⁺ (**Fig. 137**) en cada uno de los estadios analizados tanto en timos WT como mutantes. A diferencia de los timocitos cuyo índice de proliferación se mantenía prácticamente constante a lo largo del desarrollo, el de las TECs WT aumentaba entre 12.5F y 13.5F para disminuir a partir de ese estadio (**Fig. 142**).

Cuando estudiamos el ciclo de las TECs mutantes, comprobamos que, como otros parámetros estudiados en este trabajo, su evolución era similar a la de los WT aunque con algunas diferencias que sugerían cierto desfase en los timos mutantes. Así, aunque el porcentaje de TECs mutantes en ciclo aumentaba entre 12.5F-13.5F, el posterior descenso observado en los WT a 14.5F sucedía a 15.5F (**Fig. 142**). Por otro lado, la proporción de TECs mutantes en ciclo era significativamente menor respecto los valores control a 12.5F y 13.5F en todos los mutantes, manteniéndose también hasta 14.5F en timos EphB3^{-/-}. Curiosamente, y a diferencia de la situación de los timocitos, a partir de este estadio no existían diferencias significativas en el ciclo de las TECs con respecto al WT, con la única excepción de un mayor ciclo a 15.5F en EphB3^{-/-}. Tampoco las había entre los timos mutantes en ningún estadio, excepto a 14.5F, donde los timos EphB3^{-/-} tenían una proliferación significativamente menor que los EphB2^{-/-} (**Fig. 142**).

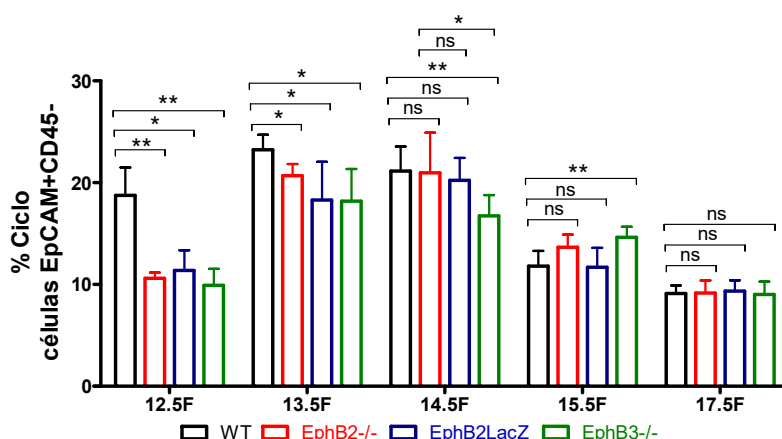


Figura 142. Proporción de células epiteliales totales EpCAM⁺CD45⁻ en ciclo en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. La gráfica muestra como la proporción de TECs en ciclo en los timos WT aumenta hasta 13.5F y, posteriormente, comienza a descender. Un patrón similar se observa en los timos deficientes en EphB, aunque el descenso en la proliferación ocurre a partir de 14.5F. Por otro lado, la proporción de TECs mutantes en ciclo es significativamente menor a 12.5F y 13.5F que en los WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Por otro lado, comparamos el número absoluto de TECs en ciclo entre timos WT y mutantes que podría ayudarnos a explicar la reducción en el número de TECs en todos los mutantes a partir de 15.5F (**ver Fig. 20**). Tal y como muestra la **Figura 143**, el número total de TECs en ciclo en los timos WT incrementaba gradualmente a lo largo del desarrollo fetal (línea negra). Cuando analizamos el número absoluto de TECs mutantes en proliferación, comprobamos, por un lado, que todos tenían un número significativamente menor de células en ciclo en todos los estadios de desarrollo y que sus cinéticas no seguían el patrón WT (**Fig. 143**). Así, en el caso de los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} había un incremento en el número de células en ciclo hasta 15.5F, y luego un descenso a 17.5F (**Fig. 143A, C** respectivamente). Esta caída concuerda con la descrita previamente en el número absoluto de TECs descrita en apartados anteriores (**ver Fig. 20**). El patrón de evolución en los timos EphB2LacZ era más parecido al de los WT, aunque sus valores eran significativamente menores a todo lo largo del desarrollo (**Fig. 143B**).

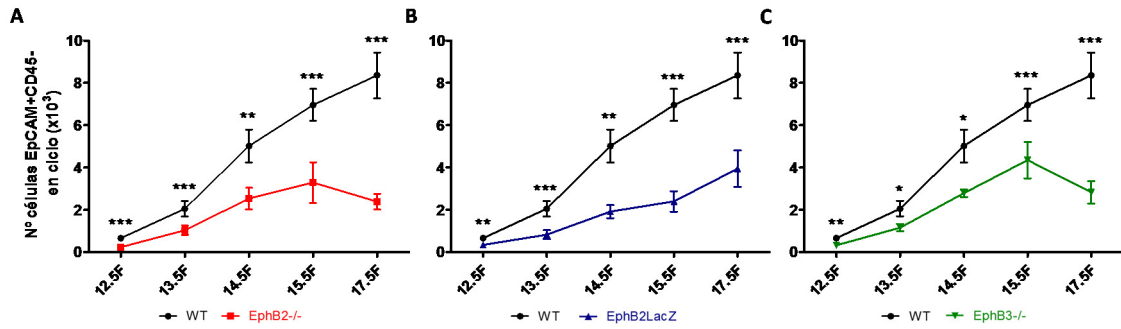


Figura 143. Números absolutos de células EpCAM⁺CD45⁻ en ciclo en timos WT y deficientes en EphB a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran como los timos EphB2^{-/-} (A), EphB2LacZ (B) y EphB3^{-/-} (C) tienen una reducción significativa en el número de TECs en ciclo entre 12.5F y 17.5F. Todos ellos incrementan el número de TECs en ciclo hasta 15.5F como los timos WT, pero EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} sufren una caída después, pero no EphB2LacZ que continúa ascendiendo. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Por otro lado, comparando el número absoluto de TECs en ciclo entre timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ (Fig. 144A) observábamos escasas diferencias entre ellos, con la excepción de un incremento significativo de células a 14.5F en los EphB2^{-/-} y un descenso a 17.5F. No había diferencias al comparar entre los valores EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} (Fig. 144B).

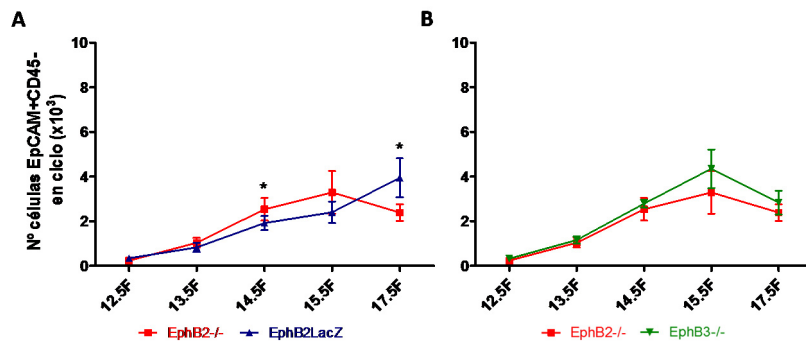


Figura 144. Números absolutos de células EpCAM⁺CD45⁻ en ciclo entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). (A) Los timos EphB2^{-/-} muestran un mayor número de TECs en ciclo a 14.5F y uno menor a 17.5F que los EphB2LacZ. No existen diferencias en ningún estadio entre los valores de EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} (B). Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la t de Student.

2.1.2.3. TECs MTS20⁺ y MTS20⁻ en ciclo durante el desarrollo tímico fetal

En un intento para identificar cuáles eran las TECs que sufrían proliferación, analizamos el ciclo de las TECs inmaduras MTS20⁺ y el de las células MTS20⁻ dentro de

la población epitelial total. Nuestros resultados muestran que la proporción de células WT en ciclo MTS20⁺ (**Fig. 145A**) y MTS20⁻ (**Fig. 145B**) seguía un patrón de evolución similar al descrito para la población epitelial total, con un incremento inicial en la proporción de TECs MTS20⁺ o MTS20⁻ en ciclo entre 12.5F y 13.5F y un gradual descenso a continuación hasta 17.5F. Cuando analizamos la proporción de células en ciclo de cada población en los

timos mutantes, observamos que la cinética volvía a ser similar a la de los timos WT, pero con algunas diferencias al comparar entre estadios, como habíamos descrito para la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻. Así, el ciclo de la población MTS20⁺ era significativamente menor en todos ellos a 12.5F (**Fig. 145A**). El ciclo de esta población era también menor a 13.5F, pero sólo significativamente en los timos EphB3^{-/-} y a 14.5F en EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}. En estadios posteriores, la proporción de células mutantes en ciclo mantenía valores más altos que las WT pero únicamente de forma

significativa a 15.5F en EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} y a 17.5F en los primeros. Por otro lado, analizando la población MTS20⁻ comprobamos que la proporción de células en ciclo era significativamente menor en todos entre 12.5F y 14.5F, sin diferencias a 15.5F, cuando la fuerte caída de la proporción de células WT en ciclo igualaba a la de las células mutantes que descendían más lentamente; de nuevo, a 17.5F las células

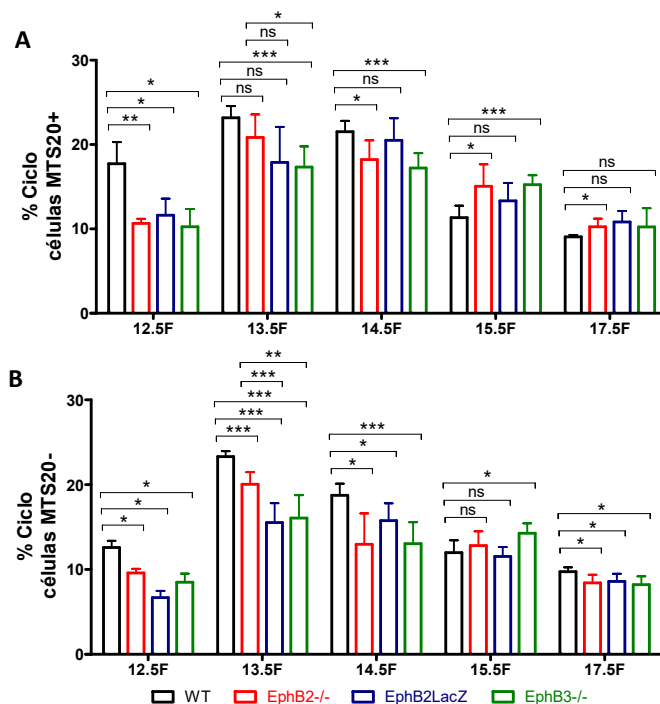


Figura 145. Proporción de células en ciclo en las poblaciones epiteliales MTS20⁺ y MTS20⁻ en timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. La proporción de células MTS20⁺ (A) y MTS20⁻ (B) en ciclo tanto en timos WT como mutantes aumenta entre 12.5F y 13.5F, para después descender gradualmente. Nótese como la proporción de células MTS20⁺ en ciclo es significativamente menor en todos los mutantes a 12.5F, mientras que para la población MTS20⁻ es menor en todos los estadios analizados, excepto a 15.5F. Sólo se observaron algunas diferencias significativas entre mutantes a 13.5F. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

mutantes ciclaban significativamente menos (**Fig. 145B**). Por otro lado, había escasas diferencias en el ciclo de ambas poblaciones al comparar entre mutantes, excepto una menor proporción de células MTS20⁺ proliferantes en los timos EphB3^{-/-} de 13.5F (**Fig. 145A**) y de células MTS20⁻ en ciclo en los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-} respecto a los EphB2^{-/-} (**Fig. 145B**).

Referimos también el porcentaje de células MTS20⁺ y MTS20⁻ en ciclo al total de células epiteliales tímicas en proliferación a fin de determinar la contribución que el ciclo de cada una de ellas tenía sobre el ciclo epitelial total y concretar así que población(es) estaría(n) contribuyendo a las diferencias descritas anteriormente en los timos mutantes (**Fig. 142**). Tal y como se muestra en la **Figura 146A**, en los timos WT la contribución de las células MTS20⁺ al ciclo total del epitelio era mayoritaria a 12.5F y 13.5F, para descender considerablemente a continuación. Por el contrario, la contribución de las células

MTS20⁻ (**Fig. 146B**) era mínima a 12.5F, aumentando entre 13.5F y 15.5F y manteniéndose igual a 17.5F. Estos datos indicaban, por tanto, que en los timos WT la proliferación epitelial ocurre en los primeros estadios (12.5F-13.5F) principalmente en

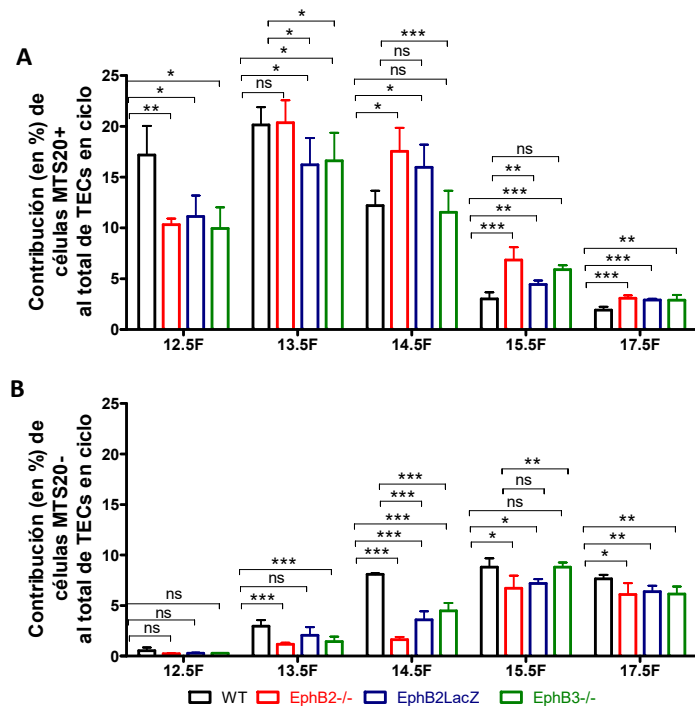


Figura 146. Contribución de las subpoblaciones MTS20⁺ y MTS20⁻ al ciclo epitelial total en los timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. (A) La contribución de las células MST20⁺ al ciclo epitelial total era mayoritaria a 12.5F y 13.5F para descender a partir de este estadio, en correlación con una mayor aportación de las células MTS20⁻ a partir del estadio 14.5F (B). Este patrón es similar en los timos deficientes en EphB; sin embargo, en todos ellos se observa una reducción en la proporción de células MTS20⁺ en ciclo a 12.5F pero no de las MTS20⁻, e incrementos significativos en la población inmadura en proliferación en todos ellos, desde 14.5F y hasta 17.5F, que correlaciona con descensos significativos en la proporción de células MTS20⁻ en esos mismos estadios. Al comparar entre mutantes, la población MTS20⁺ de los timos EphB2^{-/-} de 13.5F-15.5F contribuía más al total de TECs en ciclo, y la de MTS20⁻ entre 14.5F-15.5F menos. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

la población inmadura MTS20⁺ y a partir de 15.5F en la más madura MTS20⁻, contribuyendo ambas poblaciones en el estadio 14.5F.

Cuando se comparan las gráficas que representan las variaciones en el porcentaje de TECs totales en ciclo (**ver Fig. 142**) y las de células MTS20⁺ y MTS20⁻ en ciclo referidas a esa población epitelial total (**Fig. 146**), los resultados y, por tanto, la información que de ellos se extrae es diferente. Los porcentajes de las TECs totales mutantes en ciclo disminuían en los primeros estadios (12.5F-13.5F) pero no después, mientras que el de células MTS20⁺/MTS20⁻ en ciclo no sólo mostraban diferencias en los primeros estadios, si no durante toda la ontogenia en el caso de las MTS20⁺, y desde 13.5F en las de MTS20⁻. De este modo, la reducción en el ciclo del epitelio mutante a 12.5F es debido principalmente a un menor porcentaje de células MTS20⁺ en ciclo (**Fig. 146A**). Sin embargo, a 13.5F el menor porcentaje depende de ambas subpoblaciones MTS20⁺ y MTS20⁻ en distintas proporciones. En los timos EphB2^{-/-} contribuía el menor porcentaje de células MTS20⁻ en ciclo, en los EphB2LacZ el de las MTS20⁺ y en los EphB3^{-/-} el de ambas subpoblaciones (**Fig. 146A, B**). Como hemos comentado, a partir de 14.5F las células EpCAM⁺CD45⁻ mutantes prácticamente no mostraban diferencias en su ciclo respecto a los WT (**Fig. 142**). Este hecho se debía a la compensación que genera el aumento de porcentaje de células MTS20⁺ en ciclo y la reducción en el de células MTS20⁻ proliferantes. Así, a partir de 14.5F todos los timos mutantes mostraban valores significativamente mayores de células MTS20⁺ en ciclo (**Fig. 146A**), y menores de MTS20⁻ (**Fig. 146B**).

La comparación entre mutantes señalaba algunas diferencias en estadios concretos. A 13.5F y 15.5F los timos EphB2^{-/-} mostraban un porcentaje mayor de células MTS20⁺ en ciclo (**Fig. 146A**), pero menor de las MTS20⁻ a 14.5F en relación a los valores de los timos EphB2LacZ (**Fig. 146B**). Entre células EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} las diferencias estaban a 13.5F y 14.5F en la población MTS20⁺ donde la proporción de células en ciclo era mayor en los EphB2^{-/-} (**Fig. 146A**) y menor en la población MTS20⁻ a 14.5F y 15.5F (**Fig. 146B**).

En un intento de correlacionar las diferencias observadas con los números absolutos de células MTS20⁺ y MTS20⁻ descritos en apartados anteriores (Apartado 1.2) determinamos el número absoluto de células en ciclo en cada subpoblación. Tal y como muestran las gráficas de la **Figura 147**, el número absoluto de células WT

MTS20⁺ (línea negra) en ciclo incrementaba entre 12.5F y 14.5F para descender posteriormente hasta 17.5F. Por otro lado, aunque en los timos mutantes, esta evolución fue más o menos similar a la WT, en todos ellos hubo una reducción significativa en el número de células MTS20⁺ en ciclo entre 12.5F y 14.5F y a 17.5F, sin embargo, no se observaron diferencias a 15.5F, cuando las células WT sufren una brusca caída (Fig. 147A, B, C).

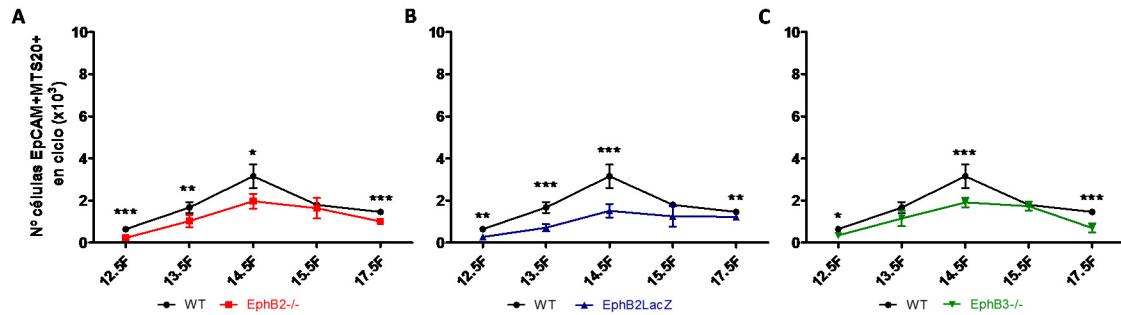


Figura 147. Análisis comparado de la evolución del número absoluto de células EpCAM⁺MTS20⁺ en ciclo entre timos WT y deficientes en EphB a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran el número absoluto de células MTS20⁺ en ciclo en timos WT y EphB2^{-/-} (A), EphB2LacZ (B) y EphB3^{-/-} (C). Tanto en timos WT como mutantes, el número absoluto de células MTS20⁺ en ciclo incrementa entre 12.5F-14.5F para descender después hasta 17.5F. Sin embargo, los timos mutantes muestran valores significativamente menores en todos los estadios analizados, excepto a 15.5F, con respecto a los valores WT. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

En el caso de las células MTS20⁻, en los timos WT su número incrementaba a lo largo de todo el desarrollo (Fig. 148, línea negra), de manera más evidente a partir de 14.5F. Esto mismo ocurría en los timos mutantes, pero con importantes diferencias respecto al patrón WT, de manera que a partir de 13.5F, pero no a 12.5F, todos ellos presentaban menos células en ciclo. La comparación entre timos mutantes y WT indicaba que los timos EphB2^{-/-} (Fig. 148A) y EphB3^{-/-} (Fig. 148C) tenían perfiles semejantes incrementando el número de células MTS20⁻ en ciclo hasta 15.5F para descender a 17.5F, mientras que en los EphB2LacZ el incremento era gradual hasta 17.5F (Fig. 148B).

Al comparar el número absoluto de células MTS20⁺ en ciclo entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (Fig. 149A) y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (Fig. 149B), sólo había diferencias entre ellos a 17.5F. Éstas fueron mayores dentro de la población MTS20⁻, donde los timos EphB2^{-/-} mostraban una reducción significativa en el número de células en ciclo con respecto a los timos EphB2LacZ (Fig. 149C) y EphB3^{-/-} (Fig. 149D) desde 13.5F, excepto a 15.5F al comparar con EphB2LacZ.

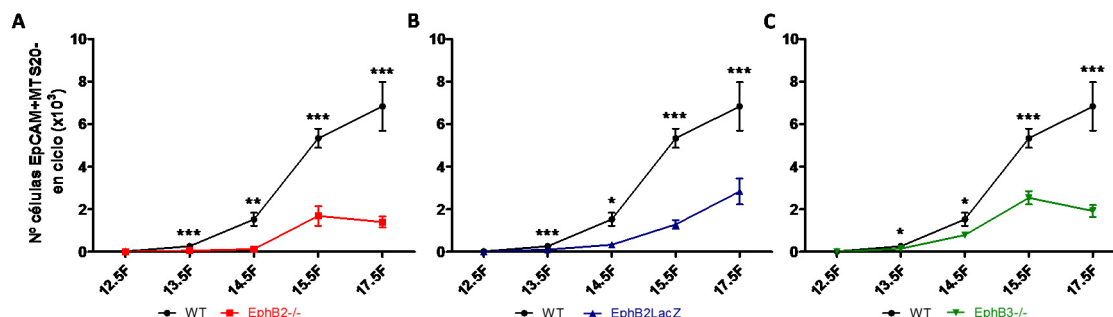


Figura 148. Análisis comparado de la evolución del número absoluto de células EpCAM⁺MTS20⁻ en ciclo en timos WT y deficientes en EphB a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran el número absoluto de células MTS20⁻ en ciclo en timos WT y EphB2^{-/-} (A), EphB2LacZ (B) y EphB3^{-/-} (C). El número de células MTS20⁻ WT aumenta a lo largo del desarrollo, igual que en timos EphB2LacZ, pero con valores significativamente más bajos desde 13.5F en estos últimos (B). En timos EphB2^{-/-} (A) y EphB3^{-/-} (C) el aumento se produce hasta 15.5F para descender a 17.5F, aunque desde 13.5F existe un número significativamente menor de células en ciclo. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

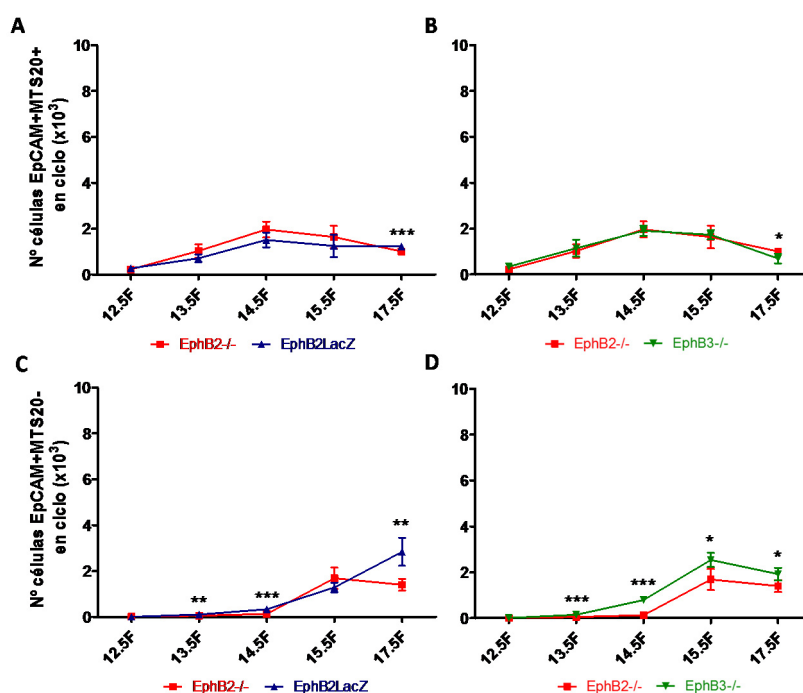


Figura 149. Análisis comparado de la evolución del número absoluto de células EpCAM⁺MTS20⁺ y EpCAM⁺MTS20⁻ en ciclo en timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). No existen diferencias en el número absoluto de células EpCAM⁺MTS20⁺ en ciclo entre timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ (A) y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} (B) excepto a 17.5F. En cambio, para la población EpCAM⁺MTS20⁻, los timos EphB2^{-/-} muestran significativamente un menor número de células en ciclo respecto a los timos EphB2LacZ (C) y EphB3^{-/-} (D) en todos los estadios analizados, excepto a 15.5F con respecto a los EphB2LacZ. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

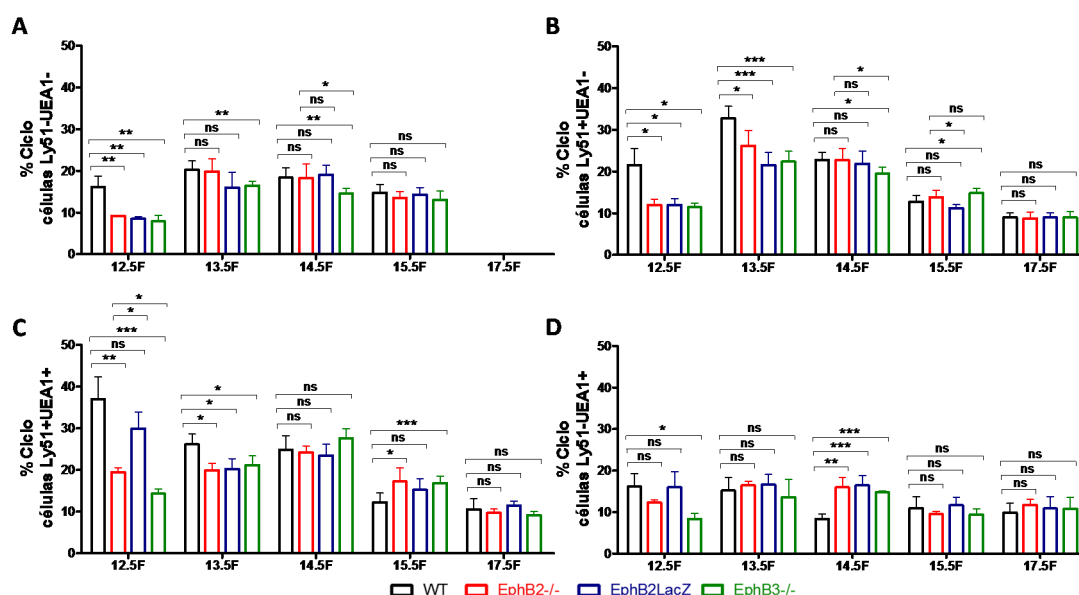
2.1.2.4. Ciclo de TECs definidas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 durante el desarrollo tímico fetal

Como antes señalábamos el análisis del ciclo en la población MTS20 no nos permitía conocer realmente que células epiteliales dividían y cuáles no. Utilizamos entonces los marcadores de epitelio cortical Ly51 y medular UEA1, para analizar su papel en la proliferación epitelial, clave para explicar el origen de las alteraciones del microambiente tímico en los ratones deficientes en EphB, estableciendo cuatro subpoblaciones: Ly51⁻UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁻UEA1⁺. No está de más recordar que a 12.5F la población Ly51⁻UEA1⁻ es lógicamente la predominante y que evoluciona aumentando primero la expresión de Ly51 y, con ello, la población cortical y después, en el timo postnatal, la medular Ly51⁻UEA1⁺ y con una población Ly51⁺UEA1⁺ particularmente importante a 17.5F. Además, en los timos mutantes se mantiene este patrón pero la evolución de las distintas subpoblaciones está retrasada respecto de la condición WT (**ver Fig. 43**).

Centrándonos en la población más inmadura (Ly51⁻UEA1⁻) en aquellos estadios en los que estaba presente (12.5F-15.5F) la proporción de células en ciclo en los timos WT apenas variaba, aunque existía un ligerísimo incremento entre 12.5F y 13.5F, para descender hasta 15.5F (**Fig. 150A**). Los timos mutantes mostraron una tendencia similar a los WT, sin embargo, en todos ellos hubo significativamente una reducción en la proporción de células en ciclo a 12.5F (**Fig. 150A**), la cual se mantenía en los timos EphB3^{-/-} hasta 14.5F. Este comportamiento a 12.5F era similar al descrito para las células MTS20⁺, que obviamente, no expresan los marcadores Ly51 ni UEA1 (**Fig. 146A**).

Analizando en los timos WT el ciclo de la población que ya expresaba Ly51, pero no aún marcadores medulares (Ly51⁺UEA1⁻), observamos que esta población presentaba un ciclo más similar al mostrado por la población epitelial total (**Fig. 142**). Así, entre 12.5F y 13.5F había un incremento en la proporción de células en ciclo para comenzar a descender entonces hasta 17.5F (**Fig. 150B**). En los timos mutantes entre 12.5F y 13.5F también observamos el incremento de células Ly51⁺UEA1⁻ en ciclo, sin embargo, no hubo un descenso a 14.5F sino a 15.5F, lo que demuestra su retraso. Además, en los dos primeros estadios comprobamos una vez más, que era donde se producían las

principales diferencias con respecto a los valores WT, ya que en todos los mutantes había un descenso significativo en la proporción de células $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ en ciclo.



Por lo que se refiere a la población intermedia $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$, que expresaba los dos marcadores utilizados, era, en general, la subpoblación que más ciclaba de las cuatro estudiadas tanto en timos WT como en los mutantes, aunque en éstos significativamente menos en los primeros estadios, 12.5F y 13.5F (Fig. 150C). Posteriormente, todos los valores caían pero más lentamente en los mutantes, que a 15.5F tenían valores más altos que los WT para igualarse de nuevo a 17.5F (Fig. 150C). Por último, el ciclo de la población medular $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ mostraba pocas variaciones entre WT y mutantes. En los primeros, los valores más altos se dan a 12.5F y 13.5F de nuevo, para caer a 14.5F y variar ya poco (Fig. 150D). En los timos mutantes había valores semejantes en los primeros estadios, cuando esta población está muy poco representada, manteniéndose a 14.5F cuando en timos WT ha caído, lo que confirma

el retraso del epitelio medular, haciendo que haya valores más altos en los mutantes (**Fig. 150D**).

Había escasas diferencias en el porcentaje de células en ciclo cuando se comparaban entre mutantes. Dentro de la población $Ly51^{-}UEA1^{-}$ (**Fig. 150A**) sólo había diferencias entre $EphB2^{-/-}$ y $EphB3^{-/-}$ a 14.5F. De nuevo, se repetía esta diferencia en el porcentaje de células en ciclo $Ly51^{+}UEA1^{-}$ (**Fig. 150B**) entre los dos mutantes a 14.5F y 15.5F y, por último, a 12.5F dentro de la población $Ly51^{+}UEA1^{+}$ (**Fig. 150C**).

Se determinó también la contribución del ciclo de cada subpoblación al ciclo del epitelio total, lo que nos ayudaría a entender cuál (es) de las cuatro poblaciones estudiadas son las que proliferan más (o menos) en cada estadio del desarrollo.

Tal y como se observa en la **Figura 151**, tanto en timos WT como en los mutantes las poblaciones epiteliales que más contribuían al ciclo total del epitelio eran las poblaciones $Ly51^{-}UEA1^{-}$ (**Fig. 151A**) y $Ly51^{+}UEA1^{-}$ (**Fig. 151B**), siendo la contribución de las poblaciones $Ly51^{+}UEA1^{+}$ (**Fig. 151C**) y $Ly51^{-}UEA1^{+}$ (**Fig. 151D**) muy escasa y bastante constante a lo largo del desarrollo tímico. Es importante aclarar que aunque, como indicábamos antes, la población $Ly51^{+}UEA1^{+}$ es la que mayor porcentaje de células en ciclo contenía, su baja representación, especialmente en los timos más tempranos, hacía que su relevancia para el porcentaje total de ciclo de las células epiteliales fuera pequeña.

El porcentaje de células $Ly51^{-}UEA1^{-}$ WT en ciclo eran las que más contribuían al ciclo epitelial total a 12.5F y 13.5F, disminuyendo después hasta 17.5F, cuando prácticamente son inexistentes (**Fig. 151A**). Por el contrario, la contribución de las células $Ly51^{+}UEA1^{-}$ en ciclo aumentaba gradualmente hasta 14.5F descendiendo luego moderadamente hasta 17.5F. Estos perfiles reflejan la relevancia que cada una de estas subpoblaciones tienen durante la ontogenia del timo. Analizando los timos mutantes, observábamos que las cinéticas de evolución de los porcentajes de células en ciclo eran similares a las de las WT en ambas poblaciones pero con importantes diferencias que reflejan los conocidos retrasos sufridos por los epitelios mutantes. Por un lado, el porcentaje de células $Ly51^{-}UEA1^{-}$ en ciclo respecto al epitelio total en ciclo era significativamente menor en los tres mutantes a 12.5F, aumentando luego tanto como los WT, pero descendiendo a partir de 13.5F, de forma más gradual de manera que mostraban valores más altos a 14.5F y, sobre todo, a 15.5F (**Fig. 151A**). En la

población $Ly51^{+}UEA1^{-}$ (**Fig. 151B**), donde los porcentajes WT suben hasta 14.5F, los mutantes lo hacen hasta 15.5F debido al retraso general de la maduración de las poblaciones epiteliales mutantes, excepto $EphB2LacZ$ que se comporta como los WT, mostrando todos ellos un ciclo menor hasta 14.5F, siendo estadísticamente significativo a 13.5F y 14.5F. A partir de 15.5F no se observaban diferencias entre WT y mutantes, debido a que mientras los WT bajaban, los mutantes seguían subiendo, para descender a 17.5F como los WT. Estos resultados reflejan en retraso en la proliferación de esta población cortical.

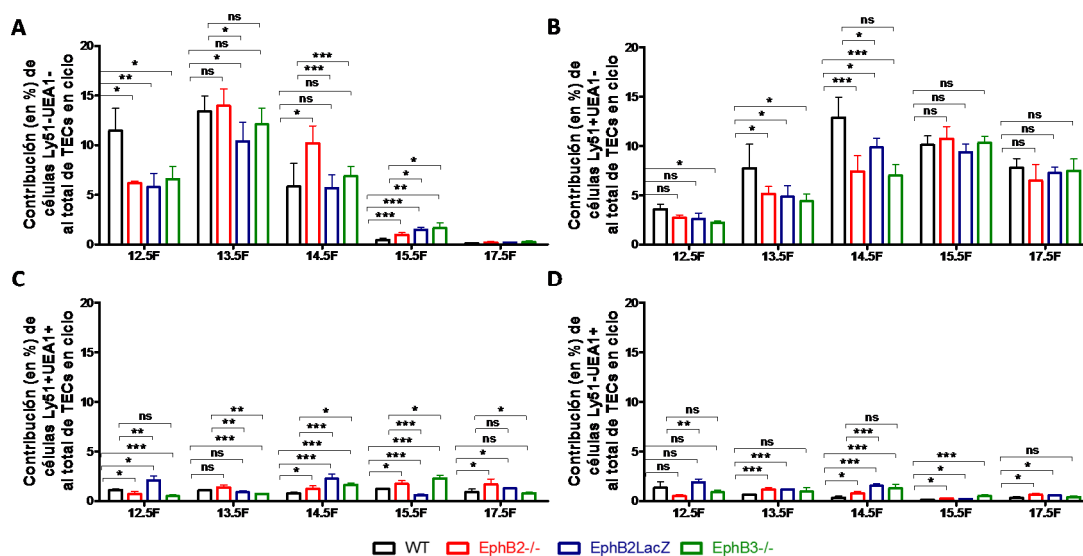


Figura 151. Contribución de las subpoblaciones $Ly51^{+}UEA1^{-}$, $Ly51^{+}UEA1^{-}$, $Ly51^{+}UEA1^{+}$ y $Ly51^{-}UEA1^{+}$ al ciclo epitelial total en los timos WT y deficientes en EphB entre 12.5F y 17.5F. Las figuras muestran la contribución de las células $Ly51^{+}UEA1^{-}$ (A), $Ly51^{+}UEA1^{-}$ (B), $Ly51^{+}UEA1^{+}$ (C), y $Ly51^{-}UEA1^{+}$ (D) al ciclo epitelial total tanto en timos WT como mutantes. Nótese como las poblaciones mayoritarias $Ly51^{+}UEA1^{-}$ y $Ly51^{+}UEA1^{-}$ en el timo temprano contribuyen en mayor medida al ciclo epitelial total, siendo la primera fundamental entre 12.5F-13.5F, y la segunda a partir de 14.5F. Las poblaciones $Ly51^{+}UEA1^{+}$ y $Ly51^{-}UEA1^{+}$ contribuyen en muy baja proporción y de forma similar durante todo el desarrollo fetal. Los timos mutantes presentan una contribución significativamente menor de la subpoblación $Ly51^{+}UEA1^{-}$ en ciclo a 12.5F y mayor a 15.5F y en la subpoblación $Ly51^{+}UEA1^{-}$ en ciclo menor a 13.5F y 14.5F respecto a los timos WT. En cambio, la contribución en los timos mutantes de los porcentajes en las subpoblaciones $Ly51^{+}UEA1^{+}$ y $Ly51^{-}UEA1^{+}$ en ciclo es, en general, significativamente mayor a partir de 14.5F. Al comparar entre mutantes se observan algunas diferencias significativas, fundamentalmente entre $EphB2^{-/-}$ y $EphB2LacZ$. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

La contribución del porcentaje de células $Ly51^{+}UEA1^{+}$ en ciclo al total del epitelio (**Fig. 151C**) en los timos mutantes mostraban valores significativamente menores a 12.5F, excepto los $EphB2LacZ$, y mayores a partir de 14.5F, salvo $EphB2LacZ$ a 15.5F y $EphB3^{-/-}$ a 17.5F (**Fig. 151C**). Sorprendentemente, la contribución del ciclo de las células

medulares Ly51⁺UEA1⁺ era significativamente más alto en todos los mutantes desde 13.5F, con la excepción de los timos EphB3^{-/-} a 13.5F y 17.5F (**Fig. 151D**), aunque tanto los valores WT como mutantes eran muy bajos. Esto posiblemente se debía a que el porcentaje de células WT en ciclo va gradualmente disminuyendo desde 12.5F, mientras que el retraso en la maduración del epitelio tímico mutante hace que los valores de estos timos permanezcan significativamente más altos que los WT. Hay que insistir, no obstante, en que la contribución durante el periodo fetal de esta población a la proliferación epitelial tímica es mínima.

A continuación, calculamos el número absoluto de células en ciclo en estas subpoblaciones. Tal y como se observa en la **Figura 152**, el número absoluto de células Ly51⁺UEA1⁺ WT en ciclo aumentaba gradualmente entre 12.5F y 14.5F para descender a continuación y prácticamente desaparecer a 17.5F (**Fig. 152**), de forma muy parecida a lo que hacían las células MTS20⁺. Tanto los timos EphB2^{-/-} (**Fig. 152A**), como los EphB3^{-/-} (**Fig. 152C**) mostraron la misma evolución que los WT, pero en ambos el número de células Ly51⁺UEA1⁺ en división fue significativamente menor, hasta 15.5F en los primeros y hasta 14.5F en los segundos. Por el contrario, los timos EphB2LacZ no incrementaban el número de células en ciclo entre 12.5F y 14.5F, sino que se mantenía prácticamente constante entre esos estadios, con valores, no obstante, significativamente menores que los WT (**Fig. 152B**).

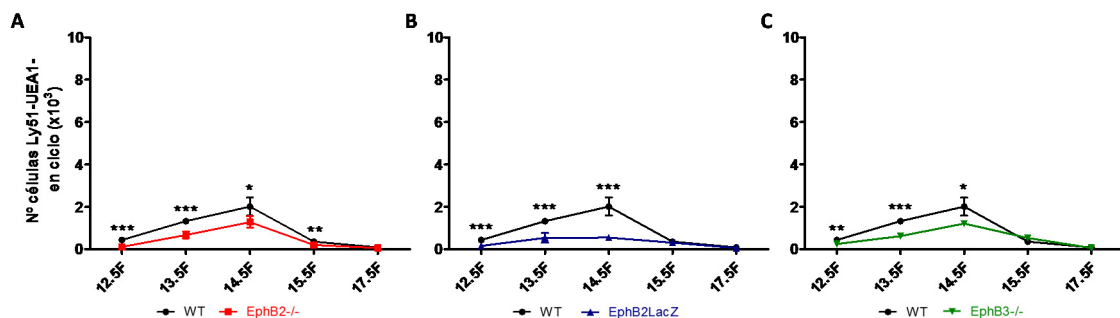


Figura 152. Análisis comparado de la evolución del número absoluto de células Ly51⁺UEA1⁺ en ciclo en timos WT y deficientes en EphB a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran el número absoluto de células Ly51⁺UEA1⁺ en ciclo en timos WT y EphB2^{-/-} (**A**), EphB2LacZ (**B**) y EphB3^{-/-} (**C**). Tanto en timos WT como mutantes el número absoluto de células Ly51⁺UEA1⁺ en ciclo incrementa entre 12.5F y 14.5F para descender después hasta 17.5F, aunque en los timos EphB2LacZ las variaciones eran escasas desde 12.5F a 17.5F. Sin embargo, todos los timos mutantes muestran un descenso significativo respecto a los valores WT entre 12.5F y 14.5F, y a 15.5F también en los timos EphB2^{-/-}. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

El número absoluto de células WT $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ en ciclo aumentaba gradualmente a lo largo del desarrollo (**Fig. 153**). Esta evolución era semejante en los timos mutantes, particularmente en los EphB2LacZ , sin embargo, en todos ellos observábamos una reducción significativa en el número de estas células en ciclo en todos los estadios analizados del desarrollo excepto a 12.5F (**Fig. 153A, B, C**). Además, en el caso de los timos $\text{EphB2}^-/-$ (**Fig. 153A**) y $\text{EphB3}^-/-$ (**Fig. 153C**), el porcentaje de células $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ en ciclo caía a partir de 15.5F, como ya habíamos visto al analizar el número de células MTS20^- en ciclo (**ver Fig. 148**). Cuando comparamos los números absolutos de células en ciclo de estas subpoblaciones, observamos que tanto en la población $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ como en la $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ existían escasas diferencias entre los mutantes $\text{EphB2}^-/-$ vs EphB2LacZ (**Fig. 154A, C**) y $\text{EphB2}^-/-$ vs $\text{EphB3}^-/-$ (**Fig. 154B, D**), diferencias que afectaban de forma puntual a algún estadio.

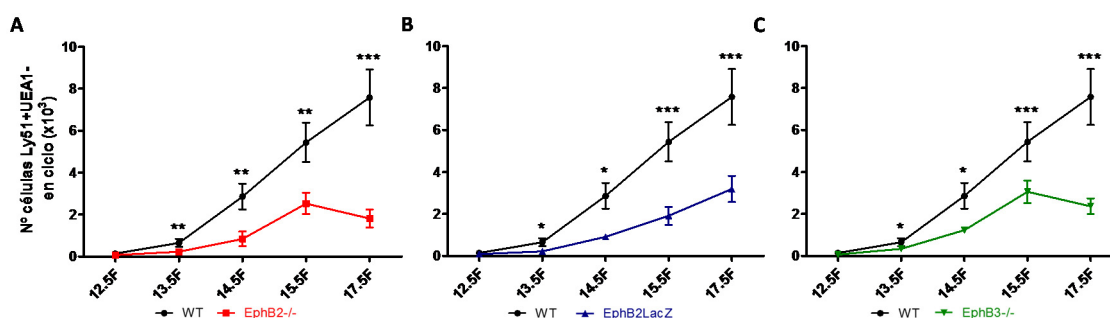


Figura 153. Análisis comparado de la evolución del número absoluto de células $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ en ciclo en timos WT y deficientes en EphB a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran el número absoluto de células $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ en ciclo en timos WT y $\text{EphB2}^-/-$ (**A**), EphB2LacZ (**B**) y $\text{EphB3}^-/-$ (**C**). En los timos WT, así como en los timos EphB2LacZ , el número absoluto de células $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ en ciclo incrementa desde 12.5F hasta 17.5F. Sin embargo, en los timos mutantes $\text{EphB2}^-/-$ y $\text{EphB3}^-/-$ este incremento sólo ocurre hasta 15.5F, momento en el que comienza a descender. Aun así, todos los timos mutantes muestran un descenso significativo desde 13.5F con respecto a los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

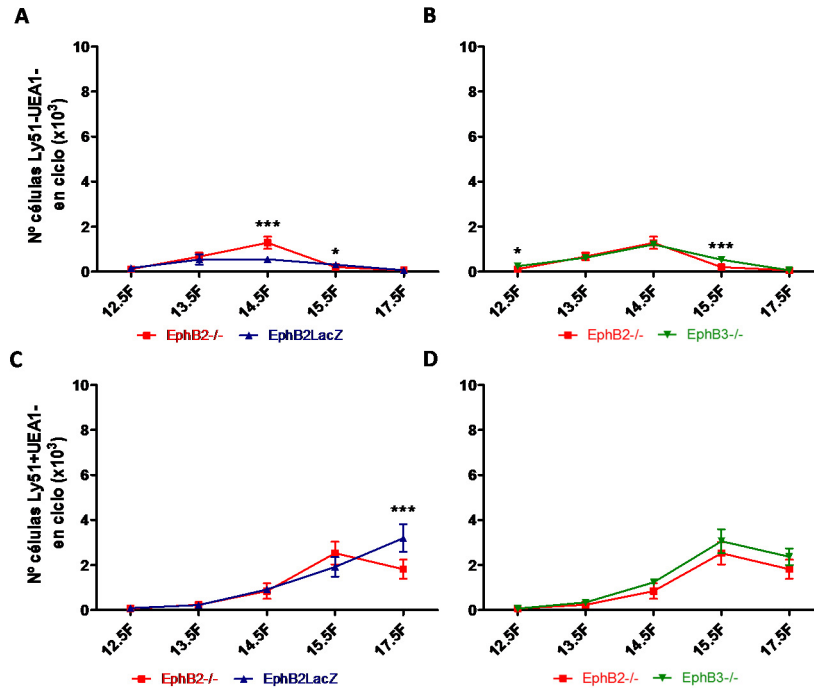


Figura 154. Estudio comparado de la evolución del número absoluto de células Ly51⁺UEA1⁻ y Ly51⁺UEA1⁻ en ciclo en tiempos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Los tiempos EphB2^{-/-} presentan un número de células Ly51⁺UEA1⁻ en ciclo significativamente mayor a 14.5F y menor a 15.5F respecto al número de los tiempos EphB2LacZ (**A**) y, en este último estadio al compararlos con los valores EphB3^{-/-} (**B**). En la población Ly51⁺UEA1⁻ sólo se observan diferencias significativas al comparar los tiempos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ a 17.5F (**C**), pero no al compararlos con los EphB3^{-/-} (**D**). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

También se estudiaron los números absolutos de células Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁺UEA1⁺ en ciclo, aunque, como antes decíamos, son pocas y contribuyen escasamente al total de células epiteliales en ciclo durante el desarrollo fetal. En los tiempos WT, el número de células Ly51⁺UEA1⁺ en ciclo incrementaba fundamentalmente entre 14.5F y 15.5F, para descender ligeramente a 17.5F (**Fig. 155**). Los tiempos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} siguen un patrón similar al WT (**Fig. 155A, C**), pero no los tiempos EphB2LacZ que entre 14.5F y 15.5F disminuyen, aumentando en el estadio siguiente (**Fig. 155B**). Al comparar con los valores WT, todos los mutantes presentaban un número de células Ly51⁺UEA1⁺ en ciclo significativamente menor a 17.5F pero también a 15.5F en los tiempos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ. Sólo a 12.5F, los tiempos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} presentaban, de nuevo, menor número de células en ciclo. Nótese, sin embargo, que los valores son muy bajos comparados con los de otras poblaciones anteriormente descritas.

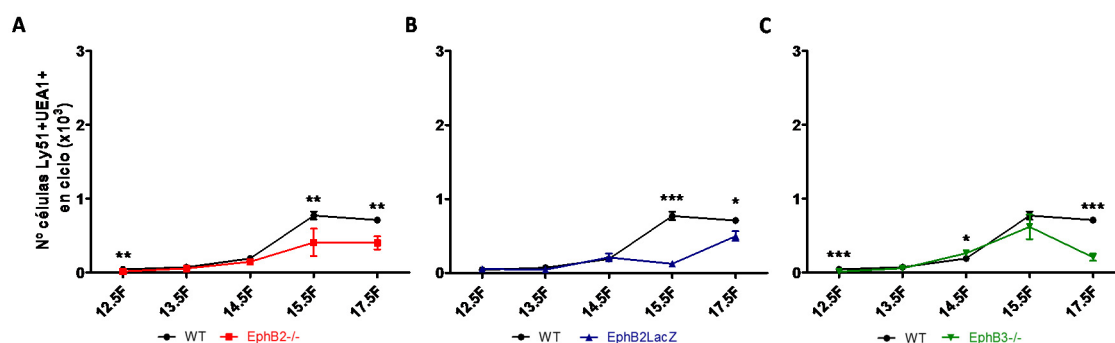


Figura 155. Análisis comparado de la evolución del número absoluto de células $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ en ciclo en timos WT y deficientes en EphB a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las figuras muestran el número absoluto de células $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ en ciclo en timos WT y $\text{EphB2}^{-/-}$ (A), EphB2LacZ (B) y $\text{EphB3}^{-/-}$ (C). En los timos WT, el número de células en ciclo incrementa desde 12.5F hasta 15.5F, para después caer ligeramente. Los timos mutantes $\text{EphB2}^{-/-}$ y $\text{EphB3}^{-/-}$ siguen el patrón WT, pero no los EphB2LacZ donde el aumento se produce entre 15.5F y 17.5F. Además, respecto a los valores WT los timos $\text{EphB2}^{-/-}$ tienen un número significativamente menor de células en ciclo a 12.5F, 15.5F y 17.5F, los EphB2LacZ a 15.5F y 17.5F y, los $\text{EphB3}^{-/-}$ a 12.5F y 17.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Por último, al estudiar el número de células en ciclo de la subpoblación $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ observábamos, que tanto en los timos WT como en los mutantes (Fig. 156), éste era muy bajo, y solamente incrementaba al final del periodo embrionario entre 15.5F y 17.5F, justo cuando la población medular empezaba a expandirse lo que culminará en el periodo postnatal. Mientras que los mutantes $\text{EphB2}^{-/-}$ y EphB2LacZ presentaban valores significativamente menores a 15.5F (Fig. 156A, B), los $\text{EphB3}^{-/-}$ (Fig. 156C) lo hacían a 17.5F, siendo en estadios anteriores incluso superiores.

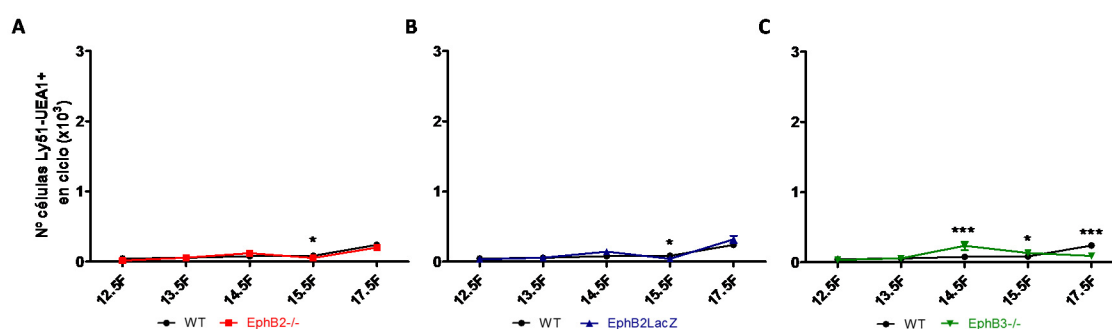


Figura 156. Análisis comparado de la evolución del número absoluto de células $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ en ciclo en timos WT y deficientes en EphB a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Las gráficas muestran el número absoluto de células $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ en ciclo en timos WT y $\text{EphB2}^{-/-}$ (A), EphB2LacZ (B) y $\text{EphB3}^{-/-}$ (C). El patrón de evolución es bastante parecido entre todos ellos, con un ligero aumento entre 15.5F y 17.5F. Los timos mutantes $\text{EphB2}^{-/-}$ y EphB2LacZ presentan un número de células en ciclo significativamente menor a 15.5F, mientras que los $\text{EphB3}^{-/-}$ lo tienen a 17.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Al comparar entre mutantes los números absolutos de estas dos últimas subpoblaciones, apenas encontrábamos diferencias entre los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ (**Fig. 157A, C**), mientras que entre EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} (**Fig. 157B, D**), los timos EphB2^{-/-} tenían un número significativamente menor de células Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁻UEA1⁺ en ciclo a 14.5F y 15.5F y mayor a 17.5F respecto a los timos EphB3^{-/-}.

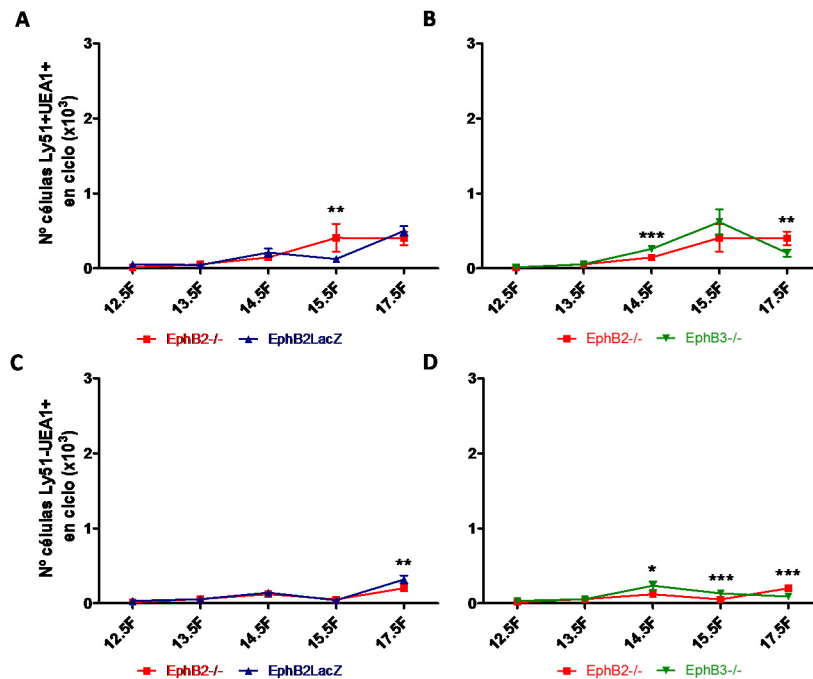


Figura 157. Estudio comparado de la evolución del número absoluto de células Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁻UEA1⁺ en ciclo en timos EphB2^{-/-} vs EphB2LacZ y EphB2^{-/-} vs EphB3^{-/-} a lo largo del desarrollo embrionario (12.5F-17.5F). Los timos EphB2^{-/-} tienen un número absoluto de células Ly51⁺UEA1⁺ en ciclo significativamente mayor a 15.5F al comparar con los timos EphB2LacZ (**A**), mientras que sólo a 17.5F frente a los EphB3^{-/-} (**B**), ya que antes (14.5F-15.5F) muestran valores menores. En cambio, para la población Ly51⁻UEA1⁺ sólo se observan diferencias significativas entre los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ a 17.5F (**C**), y de nuevo desde 14.5F a 17.5F con los EphB3^{-/-}, de la misma manera que en la población Ly51⁺UEA1⁺ (**D**). Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

En resumen, todos estos resultados demostraban claramente que los timos mutantes sufrían una reducción en la proliferación de las células epiteliales durante los primeros estadios de desarrollo (12.5F) que afectaban fundamentalmente a las TECs más inmaduras (MTS20⁺ o Ly51⁻UEA1⁻), para a continuación verse afectadas aquellas pertenecientes al linaje cortical Ly51⁺UEA1⁻ (a partir de 13.5F) que forman parte importante de la población MTS20⁻.

2.2. Retraso en la maduración fenotípica del epitelio tímico en los timos deficientes en EphB

2.2.1. La alteración en la señalización Eph/ephrina-B afecta la celularidad tímica y la maduración de las células MTS20⁺

Los resultados descritos en los apartados anteriores demostraban que los timos deficientes en EphB mostraban una reducción significativa en el número de células tímicas totales (**ver Fig. 2**, apartado 1.1), así como un retraso en la maduración de las células epiteliales tímicas inmaduras desde estadios tempranos del desarrollo (**ver Fig. 33**). Con el fin de confirmar que realmente estos cambios se debían a la falta de EphB o, lo que es lo mismo a la falta de señalización transmitida por el par Eph/ephrina-B, utilizamos un modelo de cultivo organotípico de timo fetal (FTOC) donde lóbulos tímicos WT de 13.5F fueron cultivados en presencia de las proteínas de fusión EphB2-Fc o ephrina-B1Fc solubles, utilizándose como control de los tratamientos inmunoglobulinas G humanas (hIgG). Bajo estas condiciones la interacción Eph/ephrina-B se bloqueaba como nosotros y otros autores habíamos descrito previamente (*Yu y cols., 2006; Alfaro y cols., 2007*).

Tal y como muestra la **Figura 158**, el número de células tímicas totales aumentaba gradualmente en los FTOC control, tratados con hIgG (IgG) durante los 5 días de cultivo. Cuando se analizaron los FTOC cultivados en presencia de EphB2-Fc o ephrina-B1Fc observábamos que si bien tras 2 días de cultivo no existían diferencias con respecto a los controles, a 3 y 5 días todos los lóbulos tratados mostraron un número significativamente menor de células tímicas. De hecho, al comparar la cinética de crecimiento de los lóbulos tratados y los controles, no se observaban en los primeros el aumento gradual en celularidad a lo largo del tiempo descrito en los controles; por el contrario, los números de células se mantenían más constantes a lo largo del tiempo, produciéndose sólo un ligero incremento entre 3 y 5 días de cultivo.

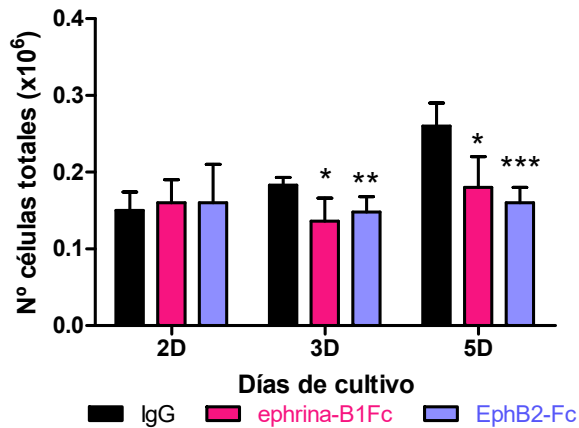


Figura 158. El tratamiento con proteínas de fusión ephrina-B1Fc o EphB2-Fc afecta la celularidad de lóbulos tímicos fetales WT de 13.5F. Lóbulos tímicos fetales de 13.5F mantenidos durante 2, 3 y 5 días (D) en cultivo organotípico (FTOC) en presencia de proteínas de fusión ephrina-B1Fc o EphB2-Fc o con inmunoglobulinas G humanas (IgG) controles. Los cultivos control incrementan su celularidad tras 5 días de cultivo, mientras el tratamiento con las proteínas de fusión produce una reducción significativa en el número de células tras 3 y 5 días de cultivo, pero no a 2 días, en comparación con los valores control. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 FTOCs analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Cuando analizamos el porcentaje de células epiteliales inmaduras MTS20⁺ existentes en las diferentes condiciones experimentales, observamos que en los lóbulos control había un descenso gradual de la proporción de células MTS20⁺ (**Fig. 159A**) hasta llegar a valores muy bajos a 5 días de cultivo, en una condición que recuerda a lo que observábamos *in vivo* durante el desarrollo tímico (**ver Fig. 32A**). Esta reducción en la proporción de células inmaduras correlacionaba con un incremento gradual del porcentaje de células MTS20⁻ (**Fig. 159B**).

Al analizar la proporción de células MTS20⁺ en los FTOC tratados con EphB2-Fc y ephrina-B1Fc, se observaba, como en los FTOCs control, que la aparición de células MTS20⁺ iba disminuyendo gradualmente (**Fig. 159A**) en igual medida que la proporción de células MTS20⁻ aumentaba (**Fig. 159B**), pero ambos procesos estaban retrasados de manera que a partir del tercer día de tratamiento, el porcentaje de células MTS20⁺ era significativamente mayor en los cultivos tratados (**Fig. 159A**) y el de células MTS20⁻ era significativamente menor (**Fig. 159B**).

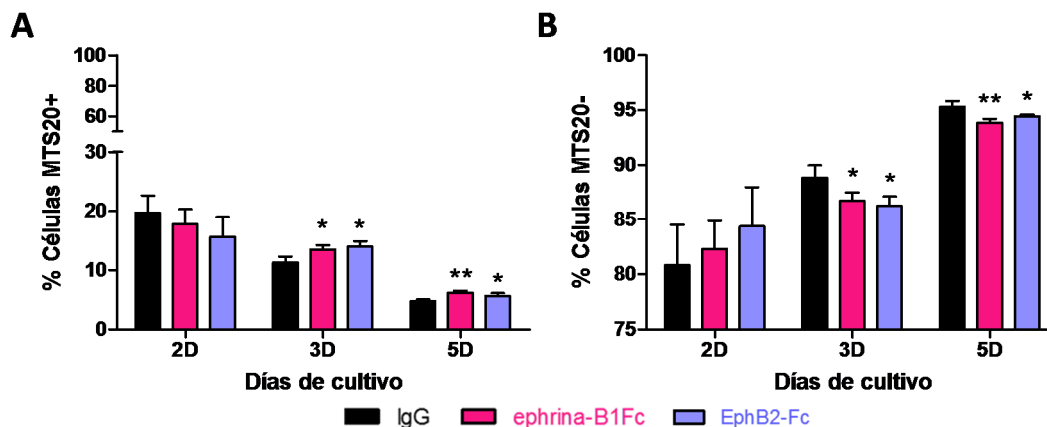


Figura 159. El tratamiento con ephrina-B1Fc y EphB2-Fc modula la maduración de las células epiteliales tímicas inmaduras (MTS20⁺). Lóbulos tímicos fetales de 13.5F fueron mantenidos en cultivo organotípico (FTOC) durante 2, 3 y 5 días (D) en presencia de proteínas de fusión ephrina-B1Fc o EphB2-Fc, utilizando como control lóbulos tratados con inmunoglobulinas G humanas (hIgG). Transcurrido esos tiempos se analizó la proporción de células epiteliales MTS20⁺ y MTS20⁻ dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻. **(A)** En los cultivos control se reduce la proporción de células MTS20⁺ tras 5 días de cultivo. El mismo patrón se observa en los cultivos tratados con las diferentes proteínas de fusión, sin embargo, el tratamiento provoca un incremento en la proporción de las células MTS20⁺ tras 3 y 5 días de cultivo. **(B)** En los cultivos control tras 5 días de cultivo incrementa la proporción de células MTS20⁻. El mismo patrón ocurre en los cultivos tratados con las diferentes proteínas de fusión, pero el tratamiento provoca una reducción en la proporción de las células MTS20⁻ tras 3 y 5 días de cultivo. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 FTOCs analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Por otro lado, tanto a nivel de la celularidad tímica (**Fig. 158**) como de la evolución del porcentaje de células MTS20⁺ y MTS20⁻ (**Fig. 159**) no había diferencias entre el tratamiento con EphB2-Fc y aquel con ephrina-B1Fc, indicando que el bloqueo de las interacciones Eph/ephrina es lo relevante y no la posible activación *forward* o *reverse* debida a la clusterización de las proteínas de fusión, dado que las vías de señalización *forward* y *reverse* no son iguales y resulta difícil creer que resulten en fenotipos iguales.

Estos resultados confirman, en definitiva, que el bloqueo de la señalización Eph/ephrinas-B genera un retraso en la maduración del epitelio tímico y en el número de células presentes en el órgano, como *in vivo* se observa en los ratones deficientes en EphB2 o EphB3.

2.2.2. Potencial de diferenciación de los progenitores epiteliales inmaduros

Como hemos comentado en numerosas ocasiones a lo largo de este trabajo, a partir de 13.5F los timos de ratones deficientes en EphB presentaban una acumulación de la

población epitelial inmadura MTS20⁺ así como un retraso en la aparición de diferentes subpoblaciones epiteliales maduras tanto corticales como medulares. Evaluamos entonces si el retraso en la aparición de estas subpoblaciones en los timos mutantes podría ser consecuencia de un menor potencial de diferenciación de sus células más inmaduras. Posteriormente, intentamos identificar la población o poblaciones más directamente implicadas en tales retrasos. Para ello, se llevaron a cabo diferentes aproximaciones experimentales que describiremos más adelante. Muchos de estos experimentos tuvieron que ser modificados debido a las dificultades técnicas que entrañaban, su baja reproducibilidad y a la escasez de resultados obtenidos, pero consideramos que es importante su descripción en este trabajo.

2.2.2.1. Capacidad de maduración de FTOCs alinfoides derivados de timos deficientes en EphB injertados *in vivo* en huésped WT o mutante

En primer lugar, analizamos el potencial de diferenciación de las células epiteliales inmaduras de lóbulos tímicos de 13.5F, alinfoides tras el tratamiento con 2'-dGuo, implantados bajo la cápsula renal de ratones receptores. En esta primera aproximación no se partía de subpoblaciones epiteliales purificadas si no de un estroma tímico completo donde, no obstante, la gran mayoría de células epiteliales mostraba un fenotipo inmaduro (MTS20⁺) típico de un lóbulo de 13.5F (**ver Fig. 32**). En estos ensayos, empleábamos lóbulos tímicos procedentes tanto de animales WT como deficientes en EphB2, EphB2LacZ y EphB3 que fueron trasplantados bajo la cápsula renal, tanto de animales WT como mutantes, y estudiados a las tres semanas (**Fig. 160**). Transcurrido ese tiempo, analizábamos el número total de células tímicas, así como poblaciones epiteliales definidas por la expresión de los marcadores MTS20, Ly51 y UEA1. El mismo protocolo se utilizó combinando distintos tipos de lóbulos donantes y ratones huéspedes (**Fig. 161**) para determinar no sólo la importancia de la ausencia de señalización EphB sobre el desarrollo de las células epiteliales tímicas sino también el efecto sobre éstas cuando la ausencia ocurría en las células linfoides del ratón huésped, que colonizarían el estroma trasplantado. Este hecho nos permitía demostrar la importancia de la señalización Eph/ephrina-B tanto de forma autónoma como de manera no autónoma sobre la diferenciación epitelial distinguiendo la relevancia de EphB2 y EphB3 en el proceso. Por otro lado, el estudio comparado de las

quimeras EphB2^{-/-} y EphB2LacZ nos permitía valorar la importancia de la señalización *forward* y *reverse* mediada a través de EphB2 para el desarrollo del epitelio tímico.

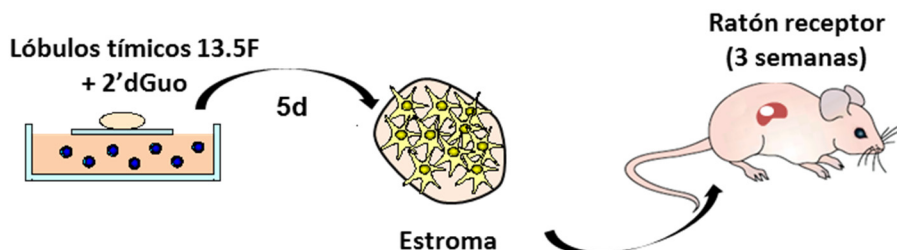


Figura 160. Implante de lóbulos tímicos alinfoides bajo la cápsula renal de ratones huéspedes. Lóbulos tímicos de 13.5F, tanto WT como deficientes en EphB, tras el tratamiento con 2'-dGuo durante 5 días, fueron implantados bajo la cápsula renal de ratones WT o mutantes. A las tres semanas, los lóbulos fueron analizados por citometría de flujo evaluándose las poblaciones epiteliales definidas por la expresión de los marcadores MTS20, Ly51 y UEA1.

RATÓN RECEPTOR (PROGENITORES LINFOIDES)	LÓBULOS TÍMICOS ALINFOIDES (ESTROMA)				
		WT	EphB2 ^{-/-}	EphB2LacZ	EphB3 ^{-/-}
	WT	X (n=9)	X (n=3)	X (n=4)	X (n=9)
	EphB2 ^{-/-}	X (n=7)			X (n=4)
	EphB2LacZ	X (n=4)			
	EphB3 ^{-/-}	X (n=8)	X (n=4)		

Figura 161. Implantes injertados bajo la cápsula renal realizados empleando lóbulos alinfoides WT o mutantes en ratones receptores WT o mutantes. El cuadro muestra las diferentes combinaciones realizadas indicándose el genotipo de los estromas empleados y el de los ratones receptores que proporcionan el tipo de progenitores linfoides que colonizan tales estromas. Para cada combinación se indica el número de implantes (n) que fueron realizados.

A las 3 semanas del trasplante, en todas aquellas combinaciones en las que el estroma (E) WT era colonizado por progenitores linfoides (PL) mutantes (E: WT; PL: EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}) (**Fig. 162B, C**) o en aquellas en las que el estroma mutante era colonizado por progenitores WT (E: EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}; PL: WT) (**Fig. 162D, E**), los lóbulos tímicos recuperados mostraban un menor tamaño al compararlos con la condición WT (E:WT; PL:WT) (**Fig. 162A**). La reducción en el tamaño de los lóbulos tímicos recuperados correlacionaba con un menor número de células en todas las condiciones (**Fig. 163**).

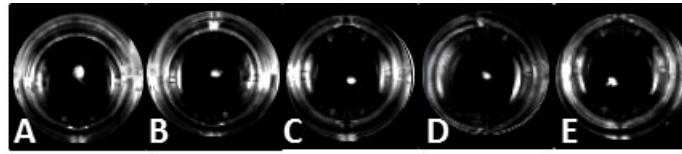


Figura 162. Tamaño de los lóbulos tímicos recuperados del riñón a las 3 semanas post-trasplante. Las imágenes muestran el tamaño de los lóbulos recuperados en las diferentes combinaciones realizadas en función del origen del estroma (E) y de las células linfoides (PL) del ratón receptor que colonizaba dicho estroma. **(A)** E: WT; PL: WT. **(B)** E: WT; PL: EphB2^{-/-}. **(C)** E: WT; PL: EphB3^{-/-}. **(D)** E: EphB2^{-/-}; PL: WT. **(E)** E: EphB3^{-/-}; PL: WT. Nótese el menor tamaño de los lóbulos recuperados en las combinaciones B, C, D y E respecto a la condición WT (A). Las imágenes son representativas de los implantes realizados.

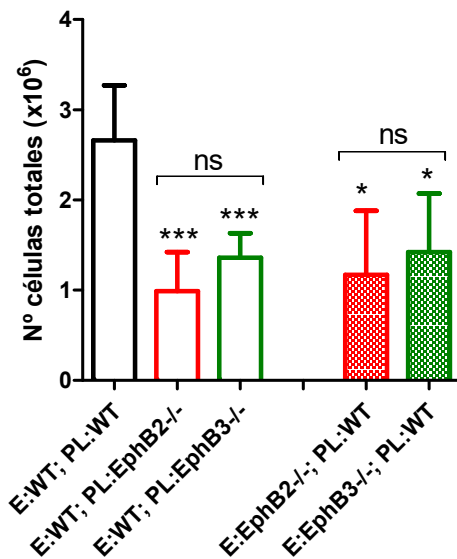


Figura 163. Celularidad de los lóbulos tímicos tras 3 semanas implantados. La gráfica muestra la celularidad de los lóbulos tímicos recuperados en las diferentes combinaciones experimentales. Nótese como en todas las condiciones donde el estroma WT era colonizado por células linfoides mutantes o donde estromas mutantes eran colonizados por progenitores WT, el número de células recuperado es significativamente menor respecto a las quimeras WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) del número de implantes realizados en cada combinación. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

A continuación, realizamos un análisis de la importancia de las señales (*forward* y *reverse*) transmitidas por EphB2 que podían estar implicadas en la celularidad y la diferenciación del epitelio utilizando ratones EphB2LacZ. Las células EphB2LacZ no son capaces de recibir señal *forward* pero sí enviar señales *reverse* a las células ephrina-B⁺ con las que interactúan, permitiéndonos comparar estos resultados con los modelos en los que empleábamos células EphB2^{-/-}, que no pueden recibir señal *forward* ni estimular una señal *reverse* en la célula ephrina-B⁺. Cuando el estroma WT era colonizado por progenitores linfoides EphB2LacZ (E: WT; PL: EphB2LacZ) no observábamos un menor tamaño en los lóbulos recuperados (**Fig. 164B**) lo que correlacionaba con una celularidad similar a la de la condición WT (**Fig. 165A**) y mayor a la de estromas WT colonizados por progenitores linfoides EphB2^{-/-} (**Fig. 165A**). En cambio, cuando el estroma EphB2LacZ era colonizado por progenitores WT (E: EphB2LacZ; PL: WT), los lóbulos recuperados eran de menor tamaño (**Fig. 164D**) lo que

correlacionaba con una celularidad menor a la de la condición WT (**Fig. 166A**), asemejándose a la condición en la que el estroma EphB2^{-/-} era colonizado por progenitores linfoides WT (**Fig. 166A**).



Figura 164. Tamaño de los lóbulos tímicos recuperados bajo la cápsula renal tras tres semanas de trasplante empleando estromas o progenitores linfoides EphB2LacZ o EphB2^{-/-}. Las imágenes muestran el tamaño de los lóbulos recuperados en las diferentes combinaciones realizadas en función de si el estroma (E) o los progenitores linfoides (PL) del ratón receptor eran EphB2LacZ o EphB2^{-/-}. **(A)** E: WT; PL: WT. **(B)** E: WT; PL: EphB2LacZ. **(C)** E: WT; PL: EphB2^{-/-}. **(D)** E: EphB2LacZ; PL: WT. **(E)** E: EphB2^{-/-}; PL: WT. Nótese el menor tamaño del lóbulo en la combinación D, respecto a la condición contraria (B), que mostraba un tamaño similar a la condición WT (A). Las imágenes son representativas de los implantes realizados.

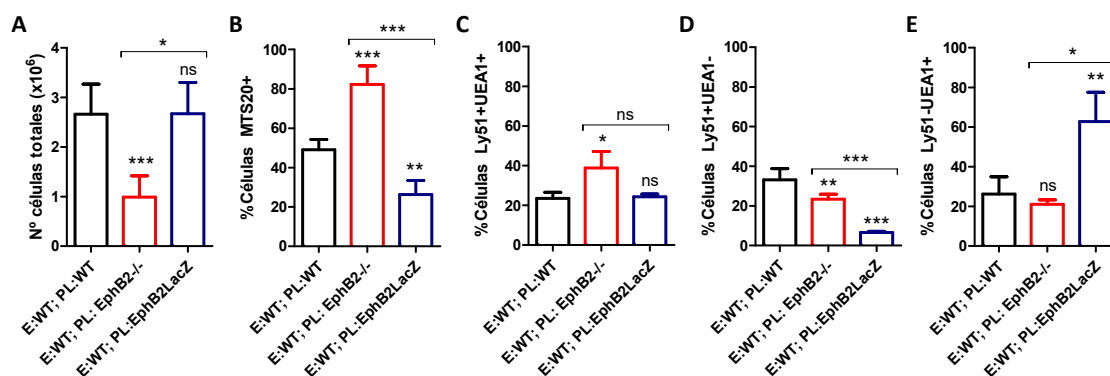


Figura 165. Análisis comparado de la celularidad y el porcentaje de las diferentes poblaciones epiteliales definidas en base a la expresión de MTS20, Ly51 y UEA1 en la condición E: WT y PL: WT, E: WT y PL: EphB2^{-/-} y E: WT y PL: EphB2LacZ tras 3 semanas de implante. **(A)** Número de células tímicas totales. Nótese como la celularidad total cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2LacZ es igual a la condición WT y, consiguientemente, mayor que en la condición en la que el estroma WT es colonizado por progenitores EphB2^{-/-}. **(B)** La proporción de células inmaduras MTS20⁺ es significativamente menor cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2LacZ con respecto a la condición WT y a la condición en la que el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2^{-/-}, donde esta población incrementa significativamente por encima de los valores WT. **(C)** La proporción de células Ly51⁺UEA1⁺ es igual a la condición WT, a diferencia de lo ocurrido cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2^{-/-}, donde esta población incrementa significativamente. **(D)** La proporción de células corticales Ly51⁺UEA1⁻ está disminuida significativamente en ambas condiciones, siendo mucho mayor cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2LacZ. **(E)** La proporción de células medulares Ly51⁻UEA1⁺ está aumentada significativamente cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2LacZ respecto a la condición WT y a la condición en la que el estroma WT es colonizado por progenitores EphB2^{-/-}. Los datos corresponden a la media (±SD) del número de implantes realizados en cada combinación. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Con respecto a las poblaciones epiteliales el comportamiento también era distinto cuando se comparaban las quimeras realizadas con EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, tanto

cuando estroma o progenitores linfoides eran WT o mutantes. En el caso de estromas WT que recibían células linfoides EphB2^{-/-}, el porcentaje de células MTS20⁺ aumentaba fuertemente (**Fig. 165B**), y también el de la población Ly51⁺UEA1⁺ (**Fig. 165C**), mientras las de Ly51⁺UEA1⁻ caía (**Fig. 165D**) y la de mTEC se mantenía en los valores control (**Fig. 165E**). Por el contrario, cuando las células linfoides eran EphB2LacZ el resultado era el inverso: caída del porcentaje de células MTS20⁺ (**Fig. 165B**) y células cTEC (**Fig. 165D**) y aumento de las mTEC (**Fig. 165E**); sin diferencias en la población intermedia Ly51⁺UEA1⁺ (**Fig. 165C**).

Si los estromas trasplantados correspondían a timos mutantes, en el caso de EphB2^{-/-} de nuevo incrementaba el porcentaje de células MTS20⁺ (**Fig. 166B**) y, fuertemente la proporción de mTEC (**Fig. 166E**) en relación a la fuerte caída de las células Ly51⁺UEA1⁻ (**Fig. 166D**) y Ly51⁺UEA1⁺ (**Fig. 166C**). Curiosamente, la combinación E: EphB2LacZ y PL: WT se comportaba como la control en todas estas poblaciones (**Fig. 166B, C, D y E**).

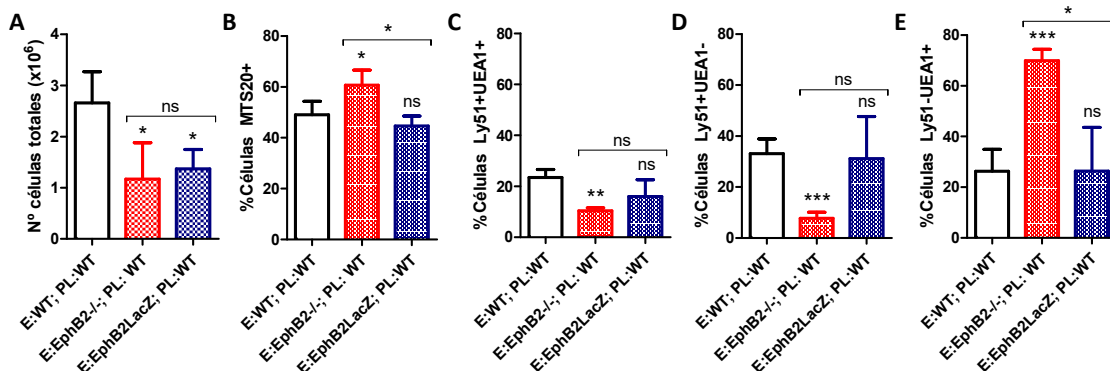


Figura 166. Análisis comparado de las diferentes poblaciones epiteliales definidas en base a la expresión de MTS20, Ly51 y UEA1 en la condición E: WT y PL: WT, E: EphB2^{-/-} y PL: WT y E: EphB2LacZ y PL: WT tras 3 semanas de implante. (A) Número de células tímicas totales. Nótese como la celularidad total cuando el estroma EphB2LacZ es colonizado por progenitores linfoides WT es significativamente menor a la condición WT, e igual respecto a la condición en la que el estroma EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores WT. (B) La proporción de células inmaduras MTS20⁺ cuando el estroma EphB2LacZ es colonizado por progenitores linfoides WT es igual a la condición WT, pero significativamente menor respecto a la condición en la que el estroma EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides WT. (C) La proporción de células Ly51⁺UEA1⁺ cuando el estroma EphB2LacZ es colonizado por progenitores linfoides WT es igual a la condición WT, pero mayor, aunque de forma no significativa, respecto a la condición en la que el estroma EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides WT. (D) La proporción de células corticales Ly51⁺UEA1⁻ cuando el estroma EphB2LacZ es colonizado por progenitores linfoides WT es igual a la condición WT, pero mayor, aunque no significativamente, respecto a la condición en la que el estroma EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides WT. (E) La proporción de células medulares Ly51⁻UEA1⁺ cuando el estroma EphB2LacZ es colonizado por progenitores linfoides WT es igual a la condición WT, pero significativamente menor respecto a la condición en la que el estroma EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides WT. Los datos corresponden a la media (±SD) del número de implantes realizados en cada combinación. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: **p*≤0.05; ***p*≤0.01; ****p*≤0.005 según el análisis estadístico de la *t* de Student.

La naturaleza de la molécula que transmite las señales también es importante. Sólo cuando el estroma era EphB3^{-/-} y los progenitores EphB2^{-/-}, el contenido celular de los lóbulos trasplantados era normal (**Fig. 167A**); por el contrario, en la combinación opuesta: estroma EphB2^{-/-} y progenitores EphB3^{-/-}, los lóbulos mostraban significativa hipocelularidad (**Fig. 167A**). Estos mismos experimentos enseñaban como la misma señalización afectaba diferencialmente distintos procesos tímicos. Así, mientras distinta distribución de EphB2 y EphB3 en estroma o progenitores resultaba en hipocelularidad o no, respecto a los otros parámetros estudiados en estas quimeras, no había diferencias entre las posibles combinaciones. En todas ellas se observaba la caída del porcentaje de células MTS20⁺ y Ly51⁺UEA1⁻ (**Fig. 167B, D** respectivamente) y el aumento de Ly51⁻UEA1⁺ (**Fig. 167E**), sin variaciones significativas en la población Ly51⁺UEA1⁺ (**Fig. 167C**).

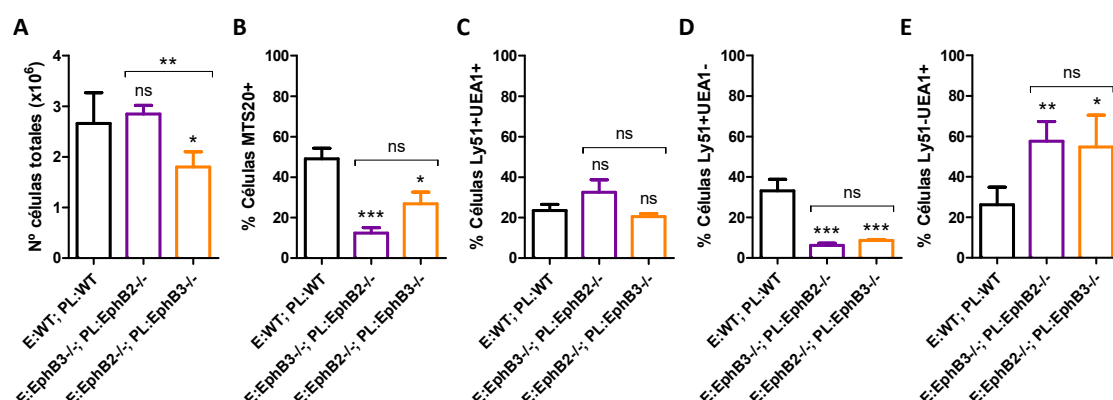


Figura 167. Análisis comparado de la celularidad y el porcentaje de las diferentes poblaciones epiteliales definidas en base a la expresión de MTS20, Ly51 y UEA1 en la condición E: WT y PL: WT, E: EphB3^{-/-} y PL: EphB2^{-/-} y E: EphB2^{-/-} y PL: EphB3^{-/-} tras 3 semanas de implante. (A) Número de células tímicas totales. Nótese como la celularidad total cuando el estroma EphB3^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides EphB2^{-/-} es igual a la condición WT, pero no cuando el estroma EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides EphB3^{-/-}. También hay diferencias significativamente cuando se comparan entre sí las dos últimas combinaciones mutantes. La proporción de células inmaduras MTS20⁺ **(B)** y de células corticales Ly51⁺UEA1⁻ **(D)** es significativamente menor cuando el estroma EphB3^{-/-} o EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} respectivamente, con respecto a la condición WT. **(C)** No se encontraron diferencias en la población Ly51⁺UEA1⁺. **(E)** La proporción de células Ly51⁻UEA1⁺ es significativamente mayor en los estromas mutantes colonizados por progenitores linfoides mutantes al comparar con la combinación WT. Los datos corresponden a la media (±SD) del número de implantes realizados en cada combinación. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

A diferencia de lo que se podía concluir acerca de la celularidad, la diferenciación de las poblaciones epiteliales se alteraba específicamente según la molécula que faltase y de forma distinta si la ausencia se producía en el estroma o en los progenitores

linfoides, aunque la señalización mediada por las Eph era igual en EphB2 y en EphB3. En ausencia de EphB2 o EphB3 en el estroma o en los progenitores los estadios iniciales de la maduración epitelial se retrasaban acumulándose las células MTS20⁺ (Fig. 168A, 169A). Cuando el estroma WT era colonizado por progenitores mutantes, la diferenciación de las poblaciones Ly51⁺ se retrasaba también: la población intermedia Ly51⁺UEA1⁺ aumentaba con diferencias significativas sólo en el caso de los progenitores EphB2^{-/-} (Fig. 168B) y la madura Ly51⁺UEA1⁻ disminuía significativamente, independientemente de la EphB que faltara (Fig. 168C). Por el contrario, la población medular Ly51⁻UEA1⁺ aumentaba significativamente con progenitores EphB3^{-/-}, pero no con los EphB2^{-/-} al comparar con los valores WT (Fig. 168D).

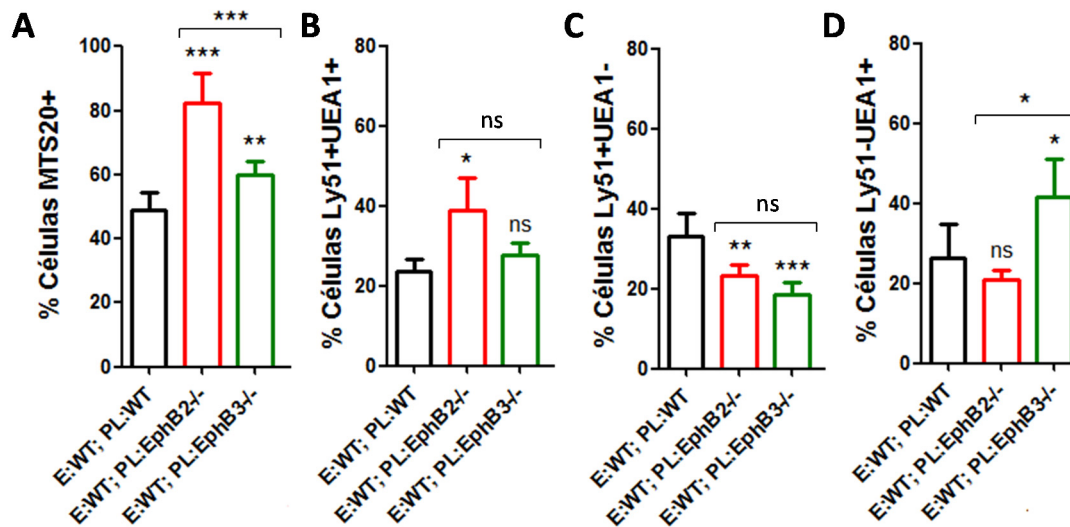


Figura 168. Análisis comparado de las diferentes poblaciones epiteliales definidas en base a la expresión de MTS20, Ly51 y UEA1 en la condición E: WT y PL: WT, E: WT y PL: EphB2^{-/-} y E: WT y PL: EphB3^{-/-} a las 3 semanas de implante. Las gráficas muestran como (A) la proporción de células epiteliales inmaduras MTS20⁺ es significativamente mayor cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} respecto a la condición WT y también cuando se compara la primera y la segunda combinación. (B) La proporción de células Ly51⁺UEA1⁺ aumenta significativamente sólo cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2^{-/-}. (C) La proporción de células corticales Ly51⁺UEA1⁻ disminuye significativamente respecto a la condición WT cuando los progenitores linfoides son mutantes. (D) La proporción de células medulares Ly51⁻UEA1⁺ aumenta significativamente cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB3^{-/-} respecto a la condición WT y también cuando al estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB2^{-/-}. Los datos corresponden a la media (±SD) del número de implantes realizados en cada combinación. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

En la condición contraria en la que estromas EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} eran colonizados por progenitores WT, las proporciones de todas las poblaciones Ly51⁺ (UEA1⁺ y UEA1⁻) (**Fig. 169B, C**) eran significativamente muy bajas en los primeros (EphB2^{-/-}) mientras en aquellos con estroma EphB3^{-/-}, no mostraban variaciones. Por el contrario, la población Ly51⁻UEA1⁺ (**Fig. 169D**) mostraba proporciones muy altas en estromas EphB2^{-/-} mientras que los EphB3^{-/-} seguían comportándose como los WT.

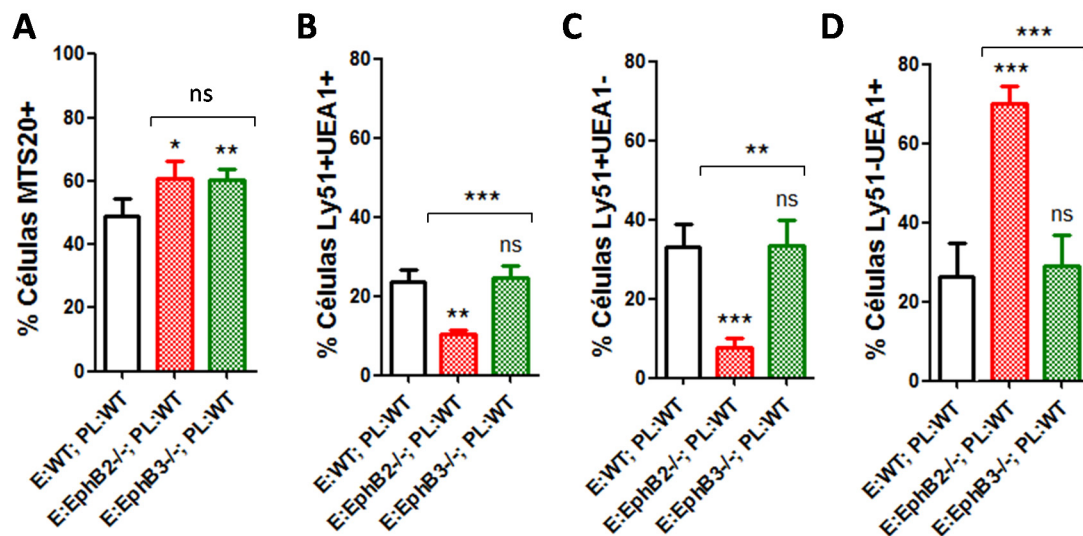


Figura 169. Análisis comparado de las diferentes poblaciones epiteliales tímicas definidas en base a la expresión de MTS20, Ly51 y UEA1 en la condición E: WT y PL: WT, E: EphB2^{-/-} y PL: WT y E: EphB3^{-/-} y PL: WT tras 3 semanas de implante. Las gráficas muestran como (A) la proporción de células epiteliales inmaduras MTS20⁺ es significativamente mayor respecto a la condición WT cuando el estroma mutante es colonizado por progenitores linfoides WT. (B, C) La proporción de células Ly51⁺UEA1⁺ (B) y corticales Ly51⁺UEA1⁻ (C) disminuye significativamente sólo cuando el estroma EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides WT respecto a la condición WT. Al comparar las combinaciones establecidas con estromas mutantes, el efecto en ambas poblaciones es mayor cuando el estroma es EphB2^{-/-}. (D) La proporción de células medulares Ly51⁻UEA1⁺ aumenta significativamente cuando el estroma EphB2^{-/-} es colonizado por progenitores linfoides WT respecto a la condición WT y también cuando el estroma WT es colonizado por progenitores linfoides EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (±SD) del número de implantes realizados en cada combinación. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

2.2.2.2. Ensayos sobre la capacidad de maduración de subpoblaciones epiteliales concretas

Esta primera aproximación utilizando lóbulos alinfoides completos trasplantados en ratones con o sin deficiencias en EphB que acabamos de describir, sólo nos permitía saber si la población heterogénea de células inmaduras que existen en el timo de 13.5F tenía mayor o menor capacidad de maduración en las distintas combinaciones

estudiadas, pero no saber el potencial de cada subpoblación y, en especial, de las células inmaduras MTS20⁺ y de otras presumiblemente intermedias que ya expresaban algún marcador cortical y/o medular. Se trataba en definitiva de intentar identificar cual o cuales eran las poblaciones epiteliales primitivas más afectadas por la falta de EphB2 o EphB3, si todavía contribuían igual al fenotipo observado y, si podían añadir información que pudiera ayudar a entender dicho fenotipo.

Antes de trabajar con ratones mutantes utilizamos solamente células WT procedentes de ratones de 12.5F para poner a punto las técnicas necesarias. Precisamente se eligió ese estadio porque el número de células MTS20⁺ es muy alto y en él, presumiblemente, a esa edad su capacidad de maduración también lo sea. En estos ensayos aislamos mediante *sorting* (ver Material y Métodos, apartado 5.1) diferentes subpoblaciones epiteliales de 12.5F definidas por la expresión de las moléculas EpCAM, CD45, MTS20, Ly51 y UEA1 siguiendo la estrategia mostrada en la **Figura 170**.

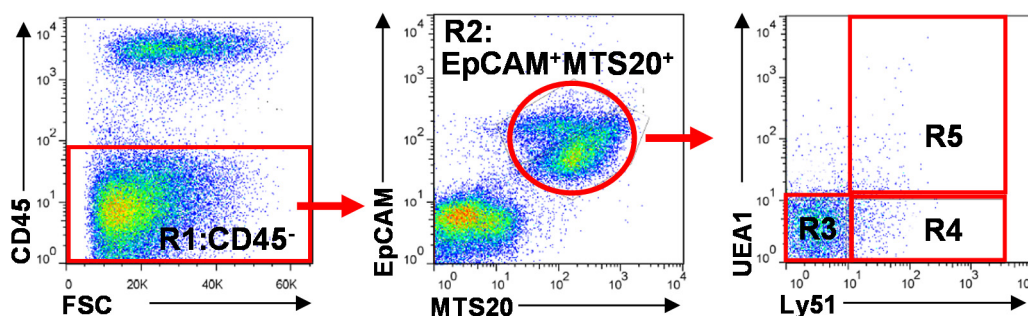


Figura 170. Protocolo de aislamiento de diferentes poblaciones epiteliales tímicas inmaduras mediante *sorting*. Los dot plots muestran un ejemplo representativo del protocolo seguido para el aislamiento de distintas subpoblaciones epiteliales inmaduras mediante el empleo de los anticuerpos anti-EpCAM, anti-CD45, anti-MTS20, anti-Ly51 y la lectina UEA1. Suspensiones tímicas totales de ratones 12.5F fueron teñidas con los anticuerpos anteriormente comentados; se delimitó la región R1 como la población estromal total (CD45⁻) y, a partir de ella, se identificaron las células epiteliales inmaduras (R2) como EpCAM⁺MTS20⁺ y, en ella se acotaron las subpoblaciones epiteliales definidas en base a la expresión de Ly51 y UEA1: R3 (Ly51⁻UEA1⁻), R4 (Ly51⁺UEA1⁻) y R5 (Ly51⁺UEA1⁺).

El número máximo y mínimo de células obtenidas para cada una de las subpoblaciones tras el *sorting* fue: EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁻ (7.5×10^3 - 44×10^3 células), EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ (1.2×10^3 - 8×10^3 células) y EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ (0.4×10^3 - 1×10^3 células). Aparte de testar las capacidades de diferenciación de las células inmaduras EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁻ pretendíamos también con estos experimentos establecer si poblaciones intermedias que expresaban ya marcadores corticales, EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻, e incluso

aquellas que expresaban marcadores corticales y medulares, EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ eran capaces de dar linajes solamente corticales o solamente medulares o de los dos compartimentos tímicos. Posteriormente, esas potencialidades serían comparadas con las de subpoblaciones epiteliales equivalentes derivadas de tímicos deficientes en EphB para ver los efectos de la falta de esas moléculas.

Tras el *sorting*, y según se ha descrito en el apartado 6.4 del Material y Métodos, cada una de las subpoblaciones fue reagregada con Matrigel, con el que pretendíamos conseguir que las células estuvieran lo más concentradas posible y se favoreciera la correcta organización 3D de las mismas *in vitro* que es clave para su diferenciación, e implantadas en ratones receptores. Transcurrido el tiempo del implante, en los 5 ensayos realizados con cada una de las subpoblaciones, no conseguimos identificar en el riñón trasplantado el crecimiento de una estructura similar a un lóbulo tímico, porque presumiblemente el número de células utilizado era insuficiente.

Procedimos entonces, a modificar el protocolo experimental, siguiendo el desarrollado por el grupo de la Doctora Clare Blackburn de la Universidad de Edimburgo (*Bennett y cols., 2002*). En esta ocasión utilizamos fibroblastos embrionarios murinos (MEF) en vez de Matrigel, para reagregar las TECs. Para determinar el número de MEFs necesarios para alcanzar la reagregación junto con las células epiteliales, realizamos previamente ensayos donde testamos diferente número de MEFs provenientes de distintos orígenes (fetos de 12.5F y 14.5F), pero sin reagregarlos con células epiteliales. Los reagregados establecidos con MEFs procedentes de fetos de 12.5F reagregaban mejor que los obtenidos de fetos de 14.5F y el número mínimo de fibroblastos necesarios para alcanzar su correcta reagregación era de 1×10^5 células. A continuación, determinamos si los MEFs tenían la capacidad de englobar las TECs cuando el número de éstas era bajo, como era nuestro caso. Para ello, hicimos reagregados utilizando 0.6×10^3 o 7×10^3 células estromales tímicas totales procedentes de lóbulos de 12.5F que habían sido cultivados previamente con 2'-dGuo durante 3 días, para eliminar los escasos timocitos que habían colonizado el primordio tímico. A continuación, los lóbulos fueron disgregados empleando tripsina 0.25x y las células resultantes fueron reagregadas con los MEF ($1-2 \times 10^5$) durante 24 horas en cultivos organotípicos (ROTC) para favorecer la correcta reagregación de los dos tipos celulares. Transcurrido este

tiempo, los reagregados fueron congelados y seccionados para su estudio histológico mediante inmunofluorescencia empleando un anticuerpo anti-PanCitoqueratina (PanCK). El análisis de estas secciones (**Fig. 171**) reveló que el protocolo experimental empleado permitía identificar las células epiteliales empleando tanto 0.6×10^3 como 7×10^3 células, pero las células aparecían dispersas entre los fibroblastos lo que hacía difícil que se crearan reagregados 3D suficientemente grandes para madurar.

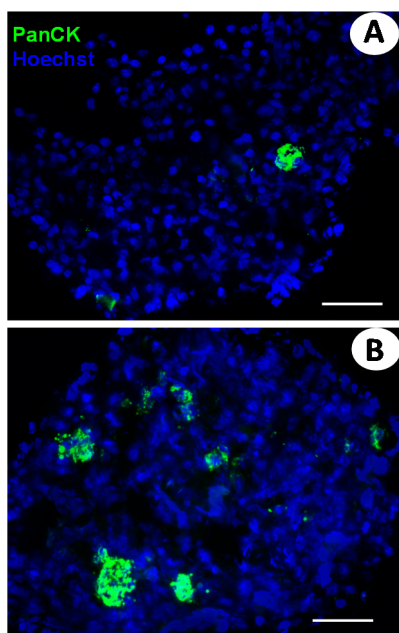


Figura 171. Identificación de células epiteliales tímicas totales en reagregados establecidos con fibroblastos embrionarios murinos. Crio-secciones de reagregados establecidos con $1-2 \times 10^5$ fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) junto con 0.6×10^3 (A) o 7×10^3 (B) células estromales tímicas totales tras 24 horas de cultivo. Las células epiteliales tímicas (TECs) fueron identificadas mediante el empleo del anticuerpo anti-PanCK (verde). Nótese la localización de los grupos de células epiteliales entre los núcleos de MEFs (azul) y como su número era mayor empleando 7×10^3 células. Escala: $20 \mu\text{m}$.

En base a todos estos resultados, llevamos a cabo reagregados empleando las subpoblaciones epiteliales sorteadas mencionadas anteriormente junto con 1×10^5 MEFs, procedentes de fetos de 12.5F (ver Material y Métodos, Apartado 6.4). Tras 2 semanas de trasplante, solamente en un ensayo de los cinco que se llevaron a cabo fuimos capaces de observar crecimiento de una pequeña masa celular en aquellos reagregados trasplantados y establecidos con las subpoblaciones epiteliales $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ y $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$, que fue disgregado y analizado por citometría de flujo en base a la expresión de los marcadores EpCAM, CD45, Ly51 y UEA1. Lo único destacable de este experimento fue que los reagregados establecidos con la población $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ diferenciaban más a células $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ que aquellos provenientes de células $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-\text{MTS20}^+\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ (**Fig. 172**), que contenían casi un 40% de células doble negativas $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$. En cuanto a las poblaciones linfoides, las células

recuperadas de los RTOCs contenían exclusivamente células DN (CD4⁻CD8⁻) (datos no mostrados).

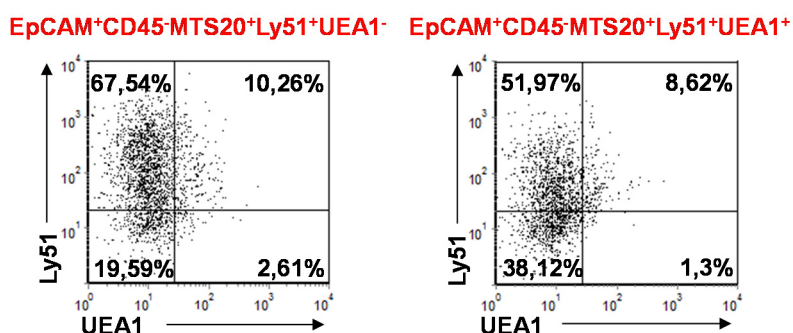


Figura 172. Análisis mediante citometría de flujo de las células epiteliales aisladas de reagregados establecidos con diferentes subpoblaciones epiteliales trasplantados durante dos semanas bajo la cápsula renal. RTOCs establecidos con MEF y células epiteliales tímicas EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ y EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺ fueron trasplantados bajo la cápsula renal de ratones WT y analizados tras 2 semanas, en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1. La proporción de células Ly51⁺UEA1⁻ fue mayor en los reagregados formados con células EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ que en los EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁺. Los dot plots muestran el resultado del único trasplante desarrollado con éxito de los cinco que se realizaron.

Los escasos resultados obtenidos hicieron plantearnos nuevas modificaciones de los cultivos en los que evaluamos las posibles causas de estos fracasos. Una posibilidad era que la falta de crecimiento de los lóbulos podría ser consecuencia de un rechazo de las células trasplantadas por el ratón receptor, rechazo que presumiblemente habría de deberse a los fibroblastos, ya que lóbulos tímicos alinfoides de 13.5F implantados bajo la cápsula renal de ratones WT no mostraban síntomas de rechazo como ya habíamos observado en trabajos anteriores (*García-Ceca y cols., 2009b*). Por otro lado, la falta de desarrollo de los reagregados podría ser consecuencia de la falta de interacciones entre las células epiteliales, ya que como hemos descrito se disponían separadas en grupos individuales entre la masa de fibroblastos. Otra posibilidad podría ser una incorrecta colonización de los reagregados por las células linfoides del huésped, dificultando la supervivencia y diferenciación de las células epiteliales tímicas, por falta de los estímulos que proporciona la interacción con ellas. Por último, no podíamos descartar la relevancia de otras señales proporcionadas por diferentes células que no estaban presentes en los reagregados como por ejemplo, el mesénquima tímico.

En base a estas consideraciones, para evitar el posible rechazo y la incorrecta colonización linfoide de los RTOCs trasplantados incorporamos timocitos (CD45⁺), procedentes de los mismos fetos (12.5F) de los que se aislaban las células epiteliales, a los reagregados de las TECs y los MEFs en una proporción del 10-15% (proporción de estas células en el animal *in vivo* en este estadio). Desgraciadamente esta aproximación tampoco resolvió los problemas de maduración de los reagregados que tras 7 días de cultivo mostraban un tamaño aún menor que al comienzo del cultivo, observándose sólo una pequeña proporción de células epiteliales en los reagregados establecidos con la subpoblación más inmadura EpCAM⁺CD45⁻MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁻ (datos no mostrados). Cuando los cultivos se mantenían *in vitro* solamente durante 3 días el número de células obtenido seguía siendo muy bajo.

Puesto que nuestra impresión era que el factor determinante de todos estos ensayos fallidos era la baja cantidad de células utilizada en la formación de los reagregados, limitada por la escasez de animales y el bajo rendimiento obtenido tras los *sorting* para cada subpoblación, utilizamos células epiteliales inmaduras MTS20⁺ totales a partir de lóbulos de 12.5F. El número de células aisladas tras el *sorting* osciló entre 1×10^4 y 6.5×10^4 , siendo reagregadas con 1×10^5 MEF y un 10-15% de timocitos procedentes de los mismos fetos. Sin embargo, tras 7 días de cultivo *in vitro*, el número de células recuperadas en los siete RTOCs generados fue de nuevo muy bajo, sin que pudiéramos obtener ningún resultado fiable (datos no mostrados).

Llegados a este punto nos preguntamos si el problema radicaba en que nuestro modelo de cultivo impedía la supervivencia de las células epiteliales. Por ello utilizamos un nuevo tipo de cultivo 3D, empleando la población epitelial inmadura EpCAM⁺MTS20⁺UEA1⁻ (ver más adelante) aislada a partir de lóbulos tímicos de ratones WT de 12.5F, puesto a punto en el laboratorio del Dr. Richard Boyd en la Universidad de Monash (Melbourne, Australia), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.2 del Material y Métodos. Tras 8 días de cultivo pudimos observar el crecimiento de colonias de células epiteliales y la presencia de timocitos en el mismo cuando se añadían (**Fig. 173**). Las células epiteliales que aparecían en los cultivos no formaban grandes agregados entre sí, sino más bien aparecían dispersas por el matrigel. En algunos casos, observábamos pequeños grupos de células, separados unos de otros, o

bien células individuales de diferentes tamaños, considerándose los agregados más grandes y refringentes colonias de células epiteliales (Ann Chidgey, comunicación personal).

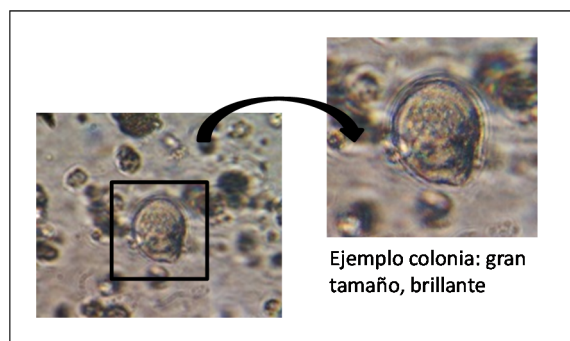


Figura 173. Cultivo de epitelio tímico 3D. La imagen muestra un ejemplo representativo de la organización celular del cultivo 3D. En detalle puede observarse una colonia de células epiteliales.

Además, tanto las células epiteliales individuales como las presentes en los grupos eran redondeadas, sin los típicos procesos celulares de la mayoría de las células epiteliales tímicas. El recuento celular de estos cultivos reveló que no había un incremento en el número de células totales, ni tampoco en ninguna de las subpoblaciones empleadas para hacer el cultivo inicialmente (MEF, TEC, timocitos) (datos no mostrados), más bien su número se reducía respecto a los valores iniciales. En el caso del número de las células epiteliales, además, no observábamos diferencias en presencia (+T) o ausencia de timocitos (-T) (**Fig. 174**). Por otro lado, el estudio por citometría de flujo mostró en los primeros cultivos estudiados que había una regulación negativa y/o una pérdida de expresión de los marcadores analizados (Ly51, MHCII, MTS20) excepto para UEA1, característica que ya había sido descrita por otros autores (*Ropke, 1997*). La realidad era que tras 8 días de cultivo, la población inicial de la que partíamos a 12.5F (EpCAM⁺MTS20⁺) que expresaba aproximadamente un 19% de Ly51⁺ ahora solamente expresaba un 10%; y lo mismo ocurría para la población MHCII⁺, que pasaba de un 22% antes del cultivo, a sólo un 6% después. En el caso de la proporción de células MTS20⁺, la caída del 95% al 5% podía deberse a su diferenciación, pero tampoco aquí podemos descartar una pérdida de expresión del marcador debido al método de cultivo (**Fig. 175**). Puesto que en la población inicial EpCAM⁺MTS20⁺ había aproximadamente un 9% de células UEA1⁺, que aumentaba ligeramente tras el cultivo (dato no mostrado), en los siguientes experimentos empleamos de inicio células EpCAM⁺MTS20⁺UEA1⁻ para ver si realmente se

diferenciaban a células UEA1⁺. Además, la presencia de timocitos procedentes de los mismos fetos, no parecía afectar la expresión de los marcadores anteriormente mencionados (datos no mostrados).

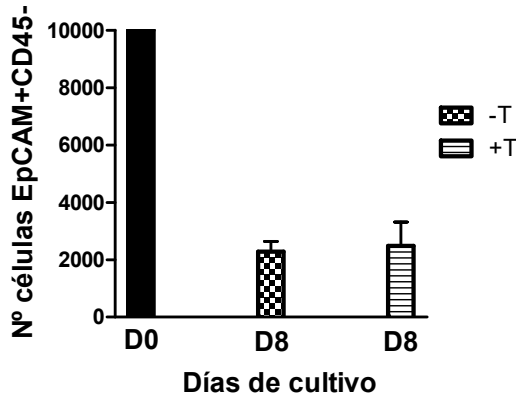


Figura 174. Número de células epiteliales (EpCAM⁺CD45⁻) recuperadas tras 8 días de cultivo. La gráfica muestra el número inicial de células epiteliales progenitoras (EpCAM⁺MTS20⁺UEA1⁻) puestas en cultivo (D0), así como el mismo número de células recuperadas (D8) en los cultivos establecidos tanto en ausencia (-T) como en presencia (+T) de timocitos. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 7 experimentos realizados.

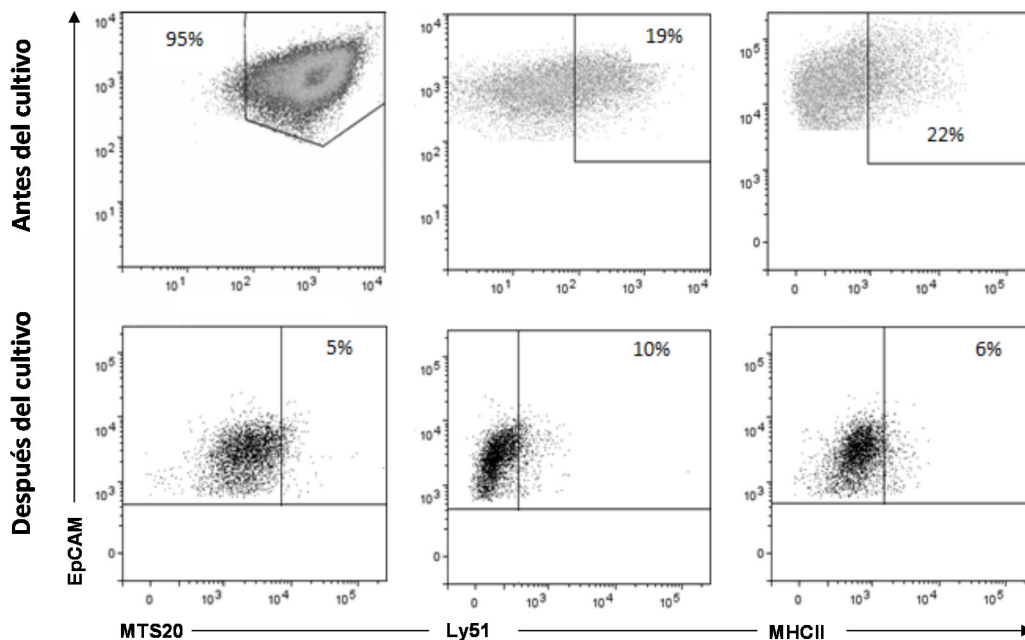


Figura 175. Expresión de diferentes marcadores en las células epiteliales antes y después de 8 días de cultivo. Los dot plots muestran el porcentaje de células MTS20, Ly51 y MHCII dentro de la población epitelial total (EpCAM⁺CD45⁻) antes y después del cultivo. Los valores corresponden a un ejemplo representativo de los 7 experimentos realizados. La expresión para cada marcador se ajustó en base a su control isotópico en los que no se incorporó el anticuerpo frente a la molécula que queríamos detectar.

Tras 8 días de cultivo nuestros resultados demostraron que a partir de la población EpCAM⁺MTS20⁺UEA1⁻ surgían dos poblaciones epiteliales: una EpCAM⁺UEA1⁺ (11%) de fenotipo medular y otra EpCAM⁺UEA1⁻ (89%) (**Fig. 176A**) que debería incluir células corticales y progenitores que no habían diferenciado, en un proceso independiente de la presencia de timocitos (-T), pues cuando se añadían al cultivo (+T), las proporciones

de células UEA1⁺ no variaban (**Fig. 176B**). Era llamativa esta falta de efectos de los timocitos sobre la diferenciación epitelial que se contradice con lo demostrado en otras partes de este trabajo y en numerosas publicaciones, pero había varias explicaciones posibles. La morfología de los cultivos sugiere que no hay muchas interacciones entre timocitos y TECs, lo que naturalmente no contribuiría a que los primeros afectaran la diferenciación de los segundos. También es posible pensar que los timocitos DN que se aislaban de los timos de 12.5F no afectaban a las TEC medulares (pero si a las corticales) aunque presumiblemente, tras 8 días de cultivo, al menos algunos habrían alcanzado el estadio DP o SP necesario para la maduración medular. Desgraciadamente, la utilización de liberasa para la digestión de los cultivos eliminaba la expresión de CD4 y CD8 de la superficie celular por lo que este último extremo no pudo ser evaluado. El resumen de todos estos análisis es que este tipo de cultivo tampoco resolvía nuestros problemas por las muchas limitaciones técnicas que conllevaban, y que por una u otra razón, resultaba en la desaparición de marcadores y una diferenciación prioritaria a epitelio medular.

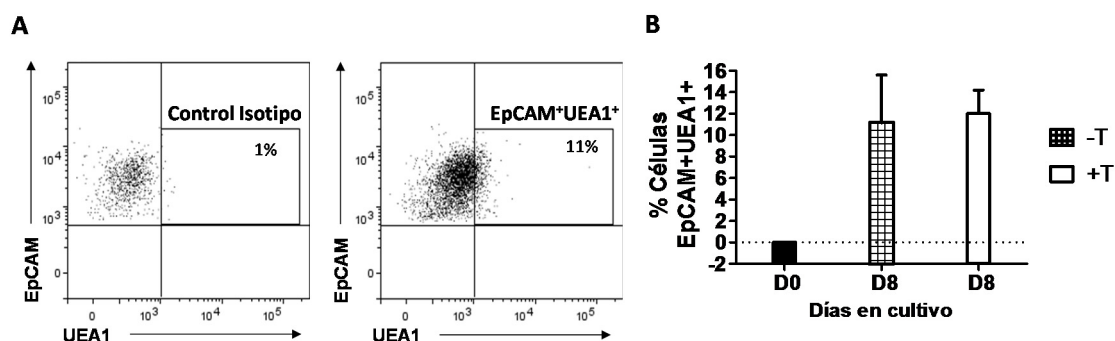


Figura 176. Expresión de UEA1 después de 8 días de cultivo. (A) Los *dot plot* muestran un ejemplo representativo de los experimentos realizados donde se describe el porcentaje de células UEA1⁺ dentro de la población EpCAM⁺CD45⁻ tras el cultivo. La población UEA1⁺ fue definida en base a su control de isotipo. (B) La gráfica muestra el porcentaje inicial de células EpCAM⁺UEA1⁺ puestas en cultivo (D0), así como tras 8 días de cultivo (D8) tanto en ausencia (-T) como en presencia (+T) de timocitos. El porcentaje de células EpCAM⁺UEA1⁺ tras 8 días es igual tanto en ausencia como en presencia de timocitos. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 7 experimentos realizados.

No hemos conseguido, por tanto, analizar las capacidades de diferenciación de las poblaciones epiteliales tímicas concretas de los distintos tipos de ratones deficientes en EphB analizados. Para nosotros, los reagregados con fibroblastos y timocitos, trasplantados posteriormente constituyen la mejor opción pero necesitamos aislar un mayor número de TECs para lo que necesitamos disponer de muchos más ratones,

algo difícil especialmente en el caso de los mutantes y/o mejorar extraordinariamente la eficacia de nuestros aislamientos que, aunque mejorable, es ya realmente bueno, en comparación con los datos existentes en la literatura.

2.2.3. Expresión de EphB2, EphB3, ephrina-B1 y ephrina-B2

Estudios previos de nuestro grupo ya habían demostrado la expresión en el timo adulto y fetal de EphB2 y EphB3 y sus ligandos ephrina-B1 y -B2 (*Alfaro y cols., 2008; Cejalvo, 2011*), pero ahora cuantificamos por citometría de flujo esa expresión en las dos poblaciones tímicas más importantes, TECs y timocitos WT durante el desarrollo embrionario temprano (12.5F-15.5F), con el fin de saber si estas moléculas se expresaban diferencialmente en un tipo celular u otro y/o si se modulaban a lo largo del desarrollo, lo que podría contribuir a explicar las alteraciones descritas en el desarrollo de estos timos, y, quizás, la diferente severidad que muestran sus fenotipos linfoides y epitelial.

Dentro de la población linfoide CD45⁺ (**Fig. 177**), la expresión de estas moléculas era bastante baja cuando se comparaba con la expresión que las mismas tenían en la población epitelial EpCAM⁺CD45⁻ (**Fig. 178**). Por otro lado, nuestro estudio revelaba que EphB2 se expresaba en las células CD45⁺ de todos los estadios más que el resto de moléculas estudiadas (**Fig. 177**); y, que todas ellas presentaban unos niveles de expresión prácticamente constantes a lo largo del desarrollo, con pequeñas fluctuaciones únicamente en el caso de las ephrinas-B1 y -B2, que hacían que la expresión de la primera disminuyera significativamente entre 13.5F y 14.5F, y la de la segunda entre 14.5F y 15.5F (**Fig. 177**).

Dentro de la población epitelial, el patrón de expresión de los receptores EphB2 y EphB3 era bastante parecido (**Fig. 178**). Así, a 12.5F la expresión de ambas EphB alcanzaba los valores máximos reduciéndose significativamente a la mitad a 13.5F, para mantenerse en valores similares o ligeramente menores hasta 15.5F. La ephrina-B2 se expresaba mucho más que la ephrina-B1 en todos los estadios del desarrollo mostrando valores altos entre 12.5F-14.5F, con porcentajes prácticamente similares a los descritos para EphB2 y EphB3 a 12.5F, pero mayores que éstos a 13.5F y 14.5F. Entre 14.5F y 15.5F, la expresión de ephrina-B2 disminuía significativamente (**Fig. 178**). Por su parte, la expresión de la ephrina-B1 aumentaba no significativamente entre

12.5F y 13.5F para descender a partir de ese estadio, pero sin verdaderas diferencias (Fig. 178).

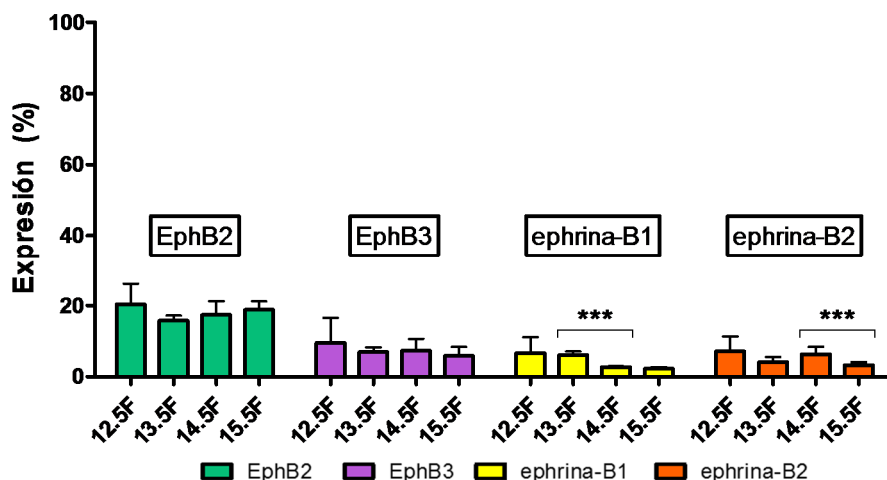


Figura 177. Expresión de EphB2, EphB3, y de sus ligandos ephrina-B1 y ephrina-B2 en la población linfocítica CD45⁺ a lo largo del desarrollo embrionario temprano (12.5F-15.5F). La gráfica muestra los niveles de expresión de estas moléculas obtenidos por citometría de flujo dentro de la población CD45⁺. Nótese como EphB2 se expresa más que el resto de moléculas en todos los estadios analizados y, como todas ellas, presentan niveles de expresión similares. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos entre estadios se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

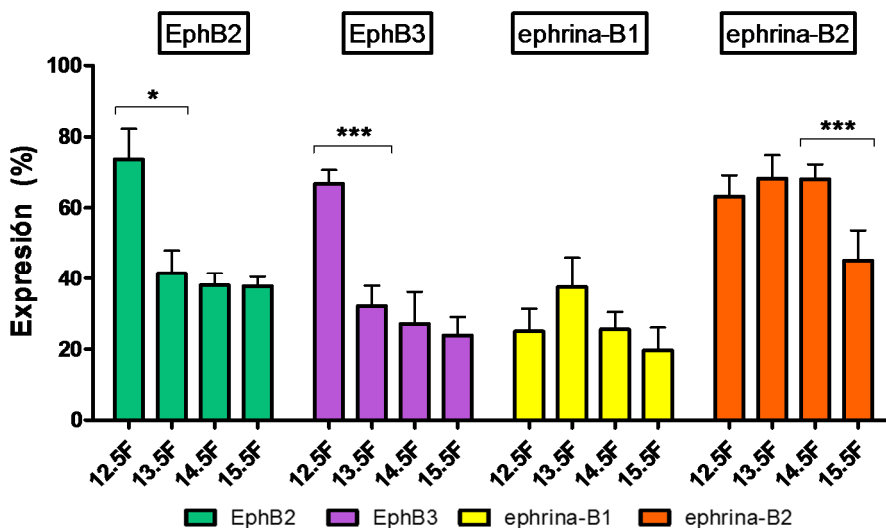


Figura 178. Expresión de EphB2, EphB3, y de sus ligandos ephrina-B1 y ephrina-B2 en la población epitelial EpCAM⁺CD45⁻ durante el desarrollo embrionario temprano (12.5F-15.5F). La gráfica muestra los niveles de expresión de estas moléculas obtenidos por citometría de flujo dentro de la población EpCAM⁺CD45⁻. Nótese como EphB2 y EphB3 muestran un patrón similar, con un descenso significativo a 13.5F que se mantiene hasta 15.5F o desciende ligeramente. Ephrina-B1 y ephrina-B2 aumentan ligeramente entre 12.5F y 13.5F para disminuir a 14.5F en el caso de ephrina-B1 y a 15.5F en el de ephrina-B2. La expresión de ephrina-B2, por su parte, es mucho mayor que la de la ephrina-B1 y que la de los receptores EphB2 y EphB3 desde 13.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos entre estadios se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Por otro lado, analizamos la expresión de estas moléculas en las subpoblaciones epiteliales definidas en base a los marcadores Ly51 y UEA1 (Ly51⁻UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁻UEA1⁺) para determinar si la expresión diferencial de algunas de estas Ephs o sus ligandos, podría explicar las diferencias observadas entre los timos mutantes durante el desarrollo temprano con respecto a los WT.

Analizando la expresión de EphB2 y EphB3 en la población más inmadura (Ly51⁻UEA1⁻) entre 12.5F y 15.5F, observábamos como el patrón de expresión de ambas moléculas era similar, con una alta expresión a 12.5F y descenso significativo hasta 14.5F, cuando volvía a aumentar (**Fig. 179A**). Los valores en todos los estadios eran, no obstante, ligeramente mayores en el caso de EphB2. La expresión de ephrina-B1 y ephrina-B2 aumentaba entre 12.5F-13.5F y descendía significativamente a 14.5F. Entre 14.5F y 15.5F el comportamiento de ambas moléculas era diferente; así, mientras la expresión de ephrina-B1 volvía a aumentar, como ocurría con EphB2 y EphB3, ephrina-B2 continuaba descendiendo, pero siempre mostrando en ese estadio, valores más altos que el resto de moléculas estudiadas (**Fig. 179A**). De cualquier manera estos patrones de evolución de las cuatro moléculas son extremadamente similares a los mostrados por la población epitelial total, especialmente hasta 14.5F.

Dentro de la población cortical Ly51⁺UEA1⁻ (**Fig. 179B**), la expresión de EphB2 y EphB3 era mayor a 12.5F para comenzar a descender desde 13.5F hasta 15.5F, como le sucede a la expresión de ephrina-B1. De nuevo la expresión de ephrina-B2 era diferente a la de las otras tres moléculas, ya que no tendía a disminuir entre 12.5F y 15.5F, si no que tenía valores constantes entre 12.5F-13.5F para aumentar significativamente a 14.5F y disminuir a 15.5F, manteniendo una vez más en este estadio una expresión mayor que las otras tres moléculas (**Fig. 179B**).

Por lo que se refiere a la población intermedia Ly51⁺UEA1⁺ (**Fig. 179C**), el patrón de expresión de las Ephs y sus ligandos fue muy similar entre sí y a aquel observado previamente en la población Ly51⁺UEA1⁻ excepto para ephrina-B2. Así, la expresión de EphB2, EphB3, ephrina-B1 y ephrina-B2 era mayor en los primeros estadios (12.5F-13.5F) y disminuía de manera gradual pero significativamente hasta 15.5F. A 15.5F la expresión de todas ellas era más baja que la observada en las dos poblaciones anteriores.

También en la población medular $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ (**Fig. 179D**) el patrón de expresión era similar al descrito para la población $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ (**Fig. 179C**). Así, la expresión de todas las moléculas fue mayor a 12.5F y 13.5F, aunque en el caso de ephrina-B1 y ephrina-B2, hubo un incremento de ambas moléculas entre 12.5F y 13.5F. A 14.5F la expresión de todas ellas disminuía significativamente hasta 15.5F, donde de nuevo los valores obtenidos fueron bajos si los comparamos con los de las poblaciones $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ (**Fig. 179A**) y $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ (**Fig. 179B**) pero similares a los de la población $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ (**Fig. 179C**).

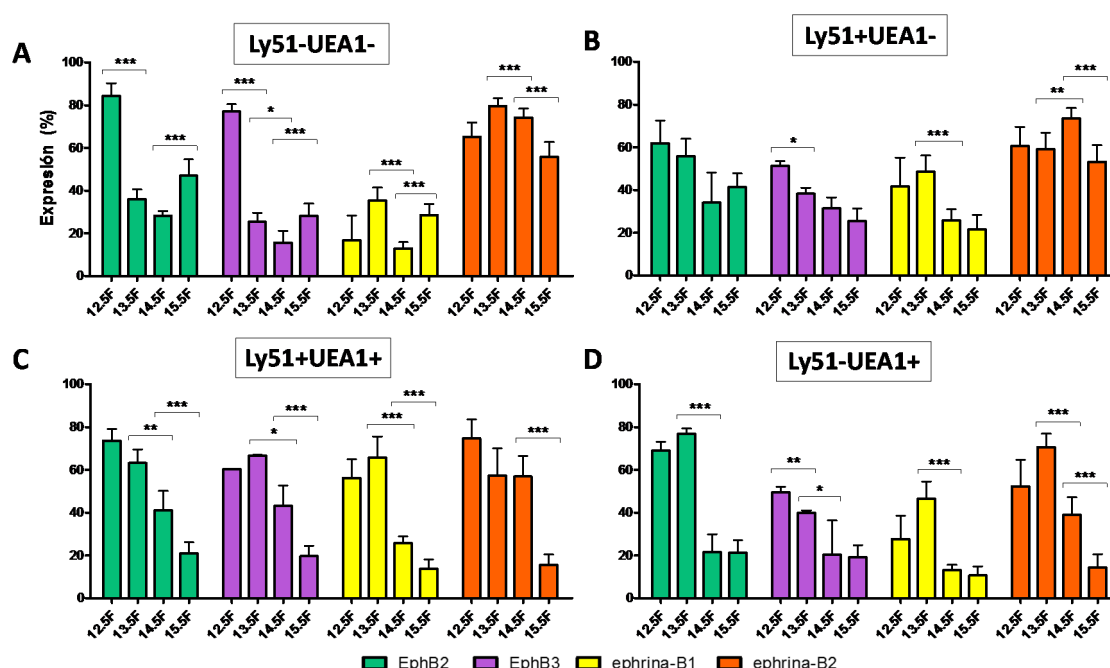


Figura 179. Expresión de EphB2, EphB3, y de sus ligandos ephrina-B1 y ephrina-B2 en las subpoblaciones epiteliales $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$, $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$, $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ y $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ durante el desarrollo embrionario temprano (12.5F-15.5F). La gráfica muestra los niveles de expresión de estas moléculas, mediante citometría de flujo, en cada una de las subpoblaciones epiteliales definidas en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1. **(A)** La expresión de EphB2 y EphB3 es similar en la población $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$: alta a 12.5F para descender hasta 14.5F y después aumentar. Ephrina-B1 aumenta entre 12.5F y 13.5F y cae a 14.5F, aumentando nuevamente a 15.5F. Ephrina-B2 desciende desde 13.5F, pero su expresión en esos estadios finales es mucho mayor que la de ephrina-B1 y que la de las dos EphB. **(B)** En la población $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$, la expresión de EphB2 y EphB3 cae gradualmente durante el desarrollo, mientras que la de ephrina-B1 lo hace a 14.5F y ephrina-B2 aumenta a 14.5F para después caer a 15.5F. **(C)** La expresión de todas las moléculas en la población $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ es alta entre 12.5F y 13.5F para después caer en los siguientes estadios, excepto ephrina-B2 que lo hace desde 14.5F. **(D)** En la población $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$, la expresión de estas moléculas cae fundamentalmente a 14.5F, manteniéndose así hasta 15.5F, excepto para ephrina-B2, que cae nuevamente a 15.5F. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos entre estadios se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Estos resultados confirman, independientemente de las particularidades apreciadas en cada población epitelial, lo observado en el epitelio total (**Fig. 178**), que eran en los

primeros estadios de desarrollo y, sobre todo, a 12.5F cuando las EphB y ephrinas-B estudiadas se expresaban más.

Dado que, por otra parte, el porcentaje de cada una de las subpoblaciones de TECs estudiadas varía a lo largo del desarrollo, calculamos la contribución de su expresión a la población epitelial total para así determinar cuál de ellas expresaba más (o menos) Eph y/o ephrinas-B durante la ontogenia. Era de esperar a tenor del porcentaje que representa cada subpoblación TEC en el primordio tímico, que la expresión de las diferentes EphB y ephrinas-B era mayor en la población más inmadura $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ (**Fig. 180A**) y en la cortical $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ (**Fig. 180B**), con escasa o nula contribución de la subpoblación intermedia $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ (**Fig. 180C**) y medular $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ (**Fig. 180D**). En la población más inmadura $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ (**Fig. 180A**) la expresión de EphB2 y EphB3 era muy importante a 12.5F (cerca de un 60% de las células $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ expresaban las Eph) para descender significativamente a 13.5F y 14.5F, y mostrar valores muy bajos a 15.5F, cuando desaparece la población. En cuanto a sus ligandos, la expresión de ephrina-B1 y ephrina-B2 disminuía entre 13.5F-14.5F y, mientras ephrina-B1 desaparecía ya en ese estadio, los valores de ephrina-B2 continuaba disminuyendo significativamente hasta 15.5F. Con todo, la caída de la expresión de ephrina-B2 es más gradual que la observada en el caso de EphB2 y EphB3 mostrando mayor expresión que las EphB a 13.5F y 14.5F (**Fig. 180A**).

Dentro de la población cortical $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ (**Fig. 180B**), la expresión de Eph/ephrinas incrementaba ligeramente durante el desarrollo, de manera significativa únicamente en el caso de EphB2 entre 14.5F y 15.5F y de la ephrina-B2 entre 13.5F y 14.5F. De nuevo, la expresión de ephrina-B2 fue mayor que el resto en estos últimos estadios.

Por último, en el caso de las poblaciones que expresan UEA1, $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ (**Fig. 180C**) y $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ (**Fig. 180D**), observábamos que la contribución de la expresión de los receptores EphB2 y EphB3 y de los ligandos ephrina-B1 y -B2 era muy baja, debido a la escasa representación que estas poblaciones tenían durante el desarrollo embrionario temprano. Aun así, la contribución de la población intermedia era mayor que la de la medular. Además, dentro de la población $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ había un descenso significativo entre 14.5F y 15.5F en la expresión de las cuatro moléculas; mientras que en la $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ ocurría entre 13.5F y 14.5F.

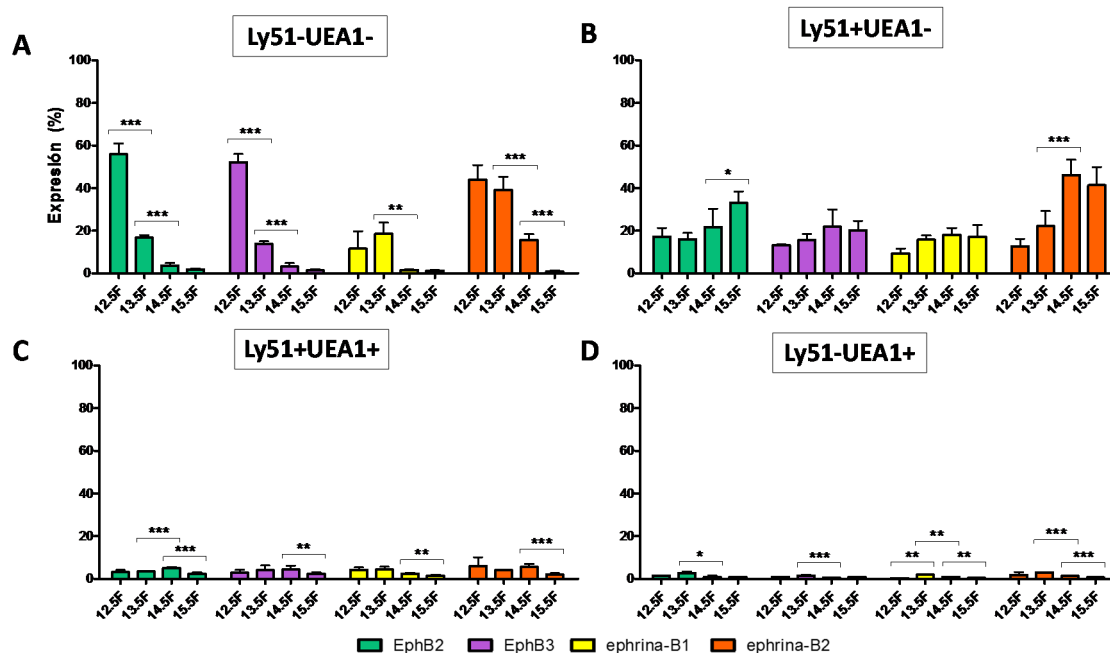


Figura 180. Contribución de la expresión de EphB2, EphB3, y de sus ligandos ephrina-B1 y ephrina-B2 en las subpoblaciones epiteliales Ly51⁻UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁻UEA1⁺ a la del epitelio total durante el desarrollo embrionario temprano (12.5F-15.5F). Las gráficas muestran los niveles de expresión de estas moléculas dentro de las subpoblaciones definidas por Ly51 y UEA1, teniendo en cuenta lo que representan cada una de ellas en el epitelio total. **(A)** La contribución de la expresión de EphB2 y EphB3 es similar en la población Ly51⁻UEA1⁻, siendo muy alta a 12.5F para caer hasta 14.5F donde desaparece. Ephrina-B1 cae entre 13.5F y 14.5F, mientras que ephrina-B2 desciende desde 13.5F. **(B)** En la población Ly51⁺UEA1⁻, la expresión de EphB2, EphB3, ephrina-B1 y ephrina-B2 aumenta ligeramente durante el desarrollo, con diferencias en algún estadio sólo para EphB2 y ephrina-B2. **(C)** La contribución de la expresión de todas las moléculas en la población Ly51⁺UEA1⁺ es muy baja durante todo el desarrollo fetal, con una caída significativa entre 14.5F y 15.5F en todas ellas. **(D)** En la población medular, estas moléculas contribuyen nuevamente muy poco a la expresión total. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos entre estadios se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

En resumen podemos concluir, por un lado, que la expresión tanto de EphB2, EphB3 y ephrina-B2, parecer ser más importante que la de ephrina-B1 y por otro, que la expresión de todas estas moléculas es mayor en los primeros estadios del desarrollo inicialmente en la población Ly51⁻UEA1⁻ (12.5F-13.5F) y a partir de 13.5F en la Ly51⁺UEA1⁻.

2.2.4. Análisis de posibles cambios en la expresión de moléculas implicadas en la maduración del epitelio tímico en ratones deficientes en EphB

Con el fin de explicar, al menos parcialmente, alguno de los resultados descritos en los apartados anteriores de este trabajo, analizamos la expresión de algunas moléculas conocidas por su implicación en el desarrollo de las TECs. Para ello, realizamos un

estudio de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) tanto en WT como mutantes, a partir de lóbulos tímicos totales de 12.5F, donde predomina el componente epitelial, o de TECs de 15.5F y 7PN y mesénquima (EpCAM⁺CD45⁻) de 15.5F, aisladas mediante *sorting* tal y como se ha descrito en el apartado 5.1 del Material y Métodos.

Determinamos, en primer lugar, la expresión del factor de transcripción epitelial Foxn1, cuya expresión se inicia a 11.25F y es absolutamente imprescindible para el correcto desarrollo de las TECs, de manera que su ausencia bloquea el desarrollo epitelial tímico e impide la colonización del primordio por los progenitores linfoides (Nehls y cols., 1996; Romano y cols., 2013). Nuestros resultados (**Fig. 181**) mostraban como tanto a 12.5F en timo total, como a 15.5F en TECs aisladas, la expresión de Foxn1 en las muestras mutantes era semejante a las de las WT; sin embargo, a 7PN las células mutantes exhibían una expresión significativamente menor en el caso de EphB2^{-/-} y EphB2LacZ. Únicamente a 12.5F, los timos EphB2^{-/-} presentaban una expresión significativamente menor que los timos EphB3^{-/-}. Estos resultados demostrarían que, al menos, en los estadios iniciales del desarrollo, la expresión de Foxn1 es igual en timos mutantes que en WT.

Analizamos tanto a 12.5F como a 15.5F la expresión del factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF7), que es liberado por las células del mesénquima circundante del primordio tímico y el conectivo trabecular y que junto con FGF10 induce la proliferación de las TECs, más que su diferenciación, al unirse al receptor FGFR2IIIb expresado en las TECs (Revest y cols., 2001; Jenkinson y cols., 2003). Aunque la expresión de FGF7 ha sido previamente descrita a 13.5F, mediante hibridación *in situ* (Revest y cols., 2001), en nuestro estudio mediante qPCR, ya a 12.5F se detectan transcritos para este factor, aunque con valores de Ct altos (datos no mostrados) que indican una baja expresión. Sin embargo, la expresión de esta molécula no mostraba diferencias significativas en los timos mutantes respecto de los WT, aunque los valores en los ratones EphB2LacZ eran significativamente mayores que en los EphB2^{-/-} (**Fig. 181**). Por el contrario, la expresión de FGF7 a 15.5F en las células mesenquimales EpCAM⁺CD45⁻ era significativamente menor en todas las células mutantes comparada con la de los timos WT.

Tal y como acabamos de describir, FGF7 regula la proliferación de las TECs uniéndose a su receptor (FGFR2IIIb) en las células epiteliales de manera que su expresión es necesaria para permitir la proliferación epitelial después de 12.5F (*Blackburn y Manley, 2004*). También en el timo postnatal se ha indicado que la señalización a través de FGFR2IIIb afecta la diferenciación y organización del epitelio tímico (*Dooley y cols., 2007*). Resultados previos de Revest y colaboradores obtenidos mediante hibridación *in situ*, revelaron que la expresión de FGFR2IIIb aparecía a 13.5F pero no a 12.5F (*Revest y cols., 2001*); sin embargo, nuestros resultados mediante qPCR mostraban que este receptor ya es detectable en este último estadio en las TECs o lóbulos. Sin embargo, tal y como se observa en la **Figura 181**, no había diferencias en los niveles de expresión de FGFR2IIIb entre células WT y mutantes. Posteriormente, la expresión de FGFR2IIIb tanto a 15.5F como a 7PN resultó ser significativamente menor en todas las células mutantes que en las WT, sin que existieran diferencias al comparar entre sí los valores mutantes.

También analizamos la expresión de IL7 y Dll4 que son producidas por las TECs y necesarias para el correcto desarrollo de los timocitos. Tal y como comentamos en la Introducción de este trabajo, IL7 es una citocina sintetizada principalmente por las cTECs que es esencial para el desarrollo temprano de los timocitos DN y también de los DP, proporcionando señales proliferativas y de supervivencia (*Ceredig y Rolink, 2012*). Transcritos de IL7 se identifican ya en el timo a 11.5F (*Zamisch y cols., 2005*). Nuestros resultados mostraban que la expresión de IL7 era menor, pero no significativamente en timos mutantes, salvo en el caso de EphB2LacZ a 7PN. (**Fig. 181**).

Por otro lado, Dll4, sintetizado por las cTEC, es uno de los ligandos del receptor Notch que interviene en la maduración de las poblaciones de timocitos DN, de tal manera que su ausencia bloquea el desarrollo de los mismos (*Hozumi y cols., 2008; Koch y cols., 2008*) y además participa en su migración y proliferación de los timocitos tempranos (*Hozumi y cols., 2008; Koch y cols., 2008; Thompson y Zuniga-Pflucker, 2011; Hirano y cols., 2015*). Los primeros transcritos de Dll4 se detectan a 12F (*Itoi y cols., 2007*). Nuestros datos confirman su presencia a 12.5F (**Fig. 181**), cuando no se observaban diferencias entre los lóbulos mutantes y WT. Más tarde, los valores mutantes disminuían, con diferencias significativas en el caso de EphB3^{-/-} tanto a

15.5F como a 7PN. Los valores EphB2^{-/-} mostraban también valores significativamente más bajos a 15.5F pero no a 7PN (**Fig. 181**).

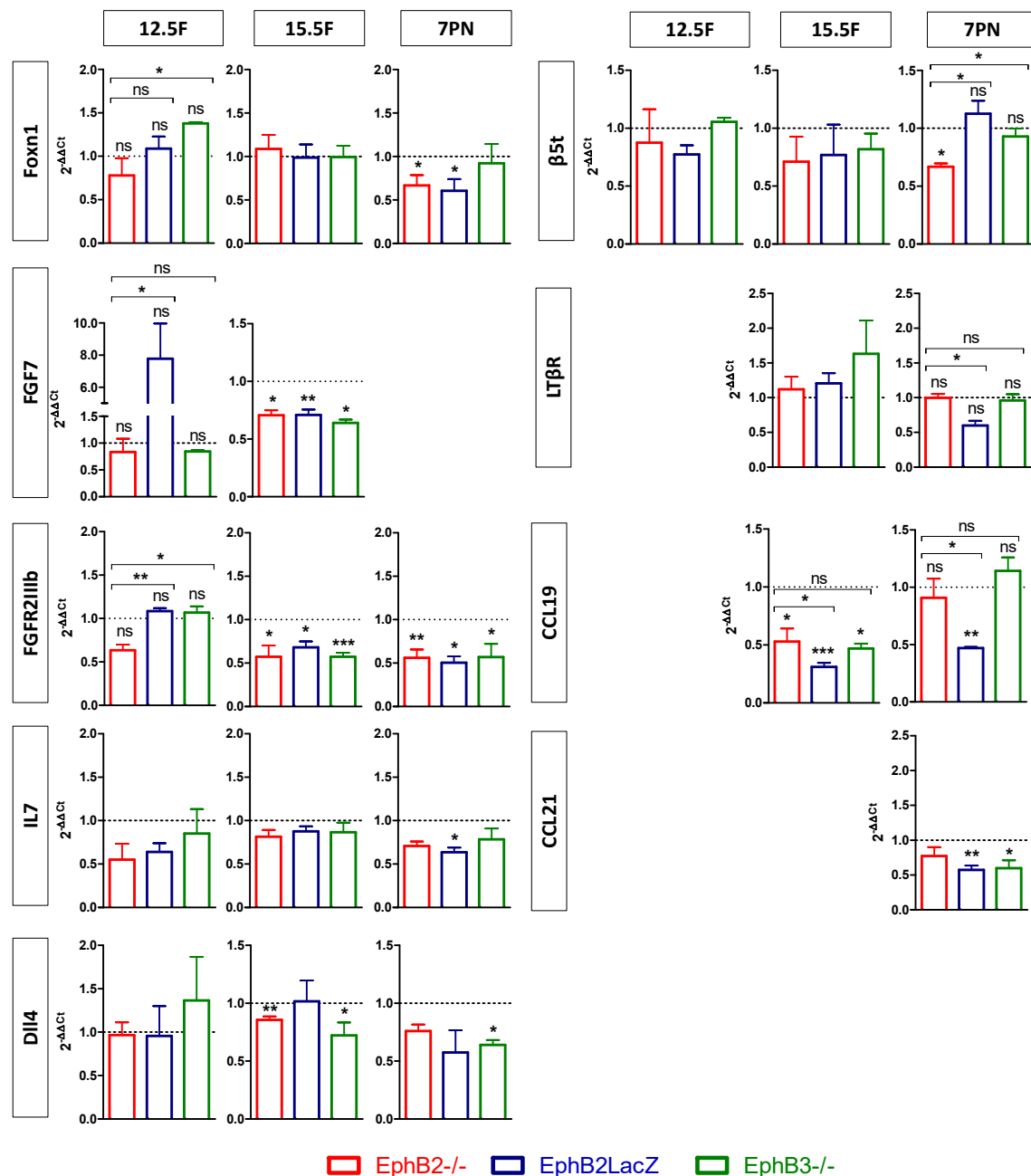


Figura 181. Análisis de la expresión de distintos genes implicados en la maduración de las TECs y timocitos, mediante PCR cuantitativa (qPCR) a 12.5F, 15.5F y 7PN en timos deficientes en EphB respecto a los timos WT. Las gráficas muestran el nivel de expresión relativa (2^{-ΔΔCt}) de Foxn1, FGF7, FGFR2IIb, IL7, Dll4, β5t, LTβR, CCL19 y CCL21 en muestras mutantes respecto a los valores WT (valor 1, línea de puntos). Las suspensiones celulares analizadas procedían de lóbulos tímicos fetales totales de 12.5F o de TECs de 15.5F y 7PN o mesénquima (EpCAM⁺CD45⁻) de 15.5F, aisladas mediante *sorting*. Los datos corresponden a la media (±SD) de 3 muestras. La comparación de los valores mutantes respecto a los WT se realizó según el análisis estadístico *one t-test* y entre mutantes según la *t* de *Student*. La significación se indica como: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005.

Por otro lado, quisimos determinar mediante qPCR la expresión del marcador funcional $\beta 5t$, que tal y como hemos descrito en la Introducción de este trabajo, su expresión comienza a 12.5F y se expresa principalmente en las cTEC (*Ripen y cols., 2011*) y quizás, en progenitores capaces de dar cTEC y mTEC (*Alves y Ribeiro, 2016*). Nuestros resultados mostraban (**Fig. 181**), tal y como describimos previamente por inmunomarcaje (Apartado 1.5.4), que a 12.5F $\beta 5t$ es expresado tanto en las TECs WT como mutantes, sin que hubiera diferencias entre ellos y al comparar entre mutantes. A 15.5F todas las TECs mutantes mostraban una expresión más baja que la de las TECs WT aunque de forma no significativa, lo que confirmaría los datos obtenidos por citometría de flujo en este estadio (Apartado 1.5.4); sin embargo, a 7PN sólo células EphB2^{-/-} mostraron niveles de expresión significativamente más bajos que las WT y las mutantes EphB2LacZ y EphB3^{-/-}.

Con respecto a moléculas conocidas por estar implicadas en la maduración del epitelio medular, se analizó la expresión del receptor para la linfotóxina β (LT β R), un miembro de la superfamilia del TNFR que es expresado por las mTEC y cuya expresión afecta la de otras moléculas también relevantes para la diferenciación de mTEC como Fefz2, RANK, CCL19 y CCL21 (*Mouri y cols., 2011; Lkhagvasuren y cols., 2013*). Nuestro estudio comenzó a 15.5F, cuando comienza la expansión de la médula. En ese estadio, la expresión de LT β R en las TECs mutantes era similar a la de las células WT (**Fig. 181**). Tampoco había diferencias en células de 7PN, salvo la menor expresión observada en las células EphB2LacZ respecto a las WT y EphB2^{-/-}. Aparte de su papel en la atracción de progenitores linfoides al interior del timo, un tema ya descrito en otros apartados de este trabajo, CCL19 y CCL21 atraen a la médula timocitos CCR7⁺ seleccionados positivamente en la corteza, donde por un lado, sufren selección negativa y, por otro, contribuyen con su señalización a la maduración del epitelio tímico, regulando la expresión de distintas moléculas (*Ueno y cols., 2004; Nitta y cols., 2009*), como LT β R que, a su vez, gobierna la de las propias CCL19 y CCL21 (*Lkhagvasuren y cols., 2013*). Nuestros resultados revelaron como la expresión de CCL19 (**Fig. 181**) en las TECs de 15.5F era significativamente más baja en los tres mutantes estudiados con respecto a los valores control, sin que hubiera diferencias entre los valores EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero sí entre EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, mostrando estos últimos una expresión significativamente menor. Sin embargo, a 7PN las células EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} no

mostraban diferencias con los valores WT, mientras las EphB2LacZ mantenían valores significativamente menores que los WT y los EphB2^{-/-}. En el caso de CCL21 sólo se valoró a 7PN, pues ya habíamos cuantificado su expresión durante el periodo embrionario mediante inmunomarcaje (ver Apartado 2.1.2.) y en estudios previos de nuestro grupo (*Stimamiglio y cols., 2010*). Así, a 7PN dicha expresión era menor en todas las TECs mutantes respecto a las WT, pero de forma significativa únicamente en los EphB2LacZ y EphB3^{-/-}, sin significación entre estos mutantes (**Fig. 181**).

3. PAPEL DE LAS INTERACCIONES T-TEC EN LA MADURACIÓN EPITELIAL TÍMICA OBSERVADA EN TIMOS DEFICIENTES EN EPHB

3.1. La presencia de timocitos y las interacciones homotípicas entre células epiteliales afectan la maduración de las células MTS20⁺

En varios apartados de este trabajo se sugiere que las distintas alteraciones fenotípicas observadas en los timos deficientes en EphB podrían deberse a la falta total o parcial de moléculas o células conocidas por estar implicadas en la maduración del epitelio tímico. En este proceso juega un papel fundamental, como han resaltado numerosos estudios las interacciones timocitos-TECs (*Klug y cols., 2002; Rossi y cols., 2007; Shakib y cols., 2009*), interacciones que en el caso de los timos mutantes podrían estar alteradas dado que el número de timocitos es menor y se han descrito peores interacciones epitelio-timocitos en los timos deficientes en EphB (*Alfaro y cols., 2011*). Por tanto, analizamos la maduración de las células MTS20⁺ en FTOCs carentes de timocitos. Para ello, realizamos FTOC empleando lóbulos tímicos de ratones WT y deficientes en EphB de 13.5F cultivados durante 5 días en presencia de 2'-dGuo, lo que nos permitía determinar la importancia de los timocitos para el desarrollo de las TECs inmaduras.

Tras 5 días de cultivo en presencia de 2'-dGuo (sin timocitos) lóbulos tímicos WT presentaban una proporción significativamente mayor de células MTS20⁺ con respecto a los cultivos no tratados, que presentaban, por tanto, timocitos (**Fig. 182A**). El incremento de la población MTS20⁺ correlacionaba con una reducción en la proporción de células MTS20⁻ en los cultivos tratados con 2'-dGuo respecto a los que lo hacían en ausencia de ésta (**Fig. 182B**). Estos resultados indicaban que la ausencia de timocitos

en los lóbulos WT provocaba un retraso en la maduración de las células epiteliales inmaduras MTS20⁺.

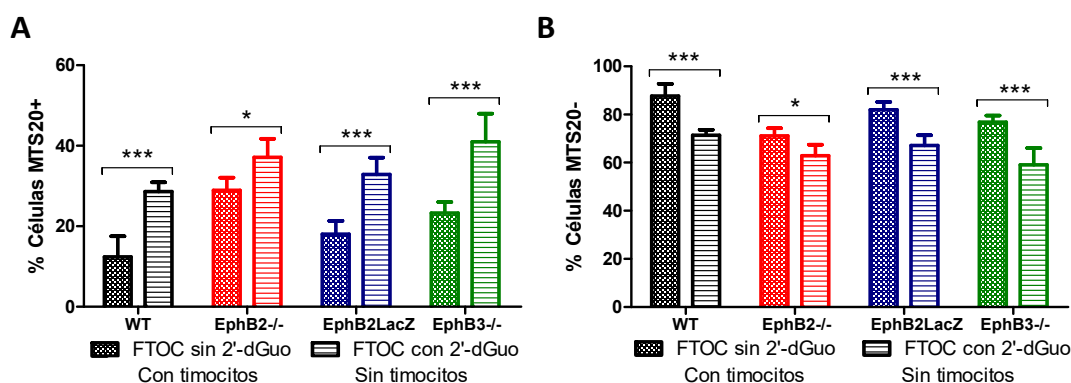


Figura 182. La ausencia de timocitos induce acumulación de células inmaduras MTS20⁺ en lóbulos tímicos WT y deficientes en EphB. Lóbulos tímicos fetales de 13.5F fueron puestos en cultivo organotípico durante 5 días en presencia o ausencia de 2'-dGuo (sin y con timocitos, respectivamente) analizándose la proporción de células MTS20⁺ (A) y MTS20⁻ (B) dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻. (A) La ausencia de timocitos (FTOC con 2'-dGuo) provoca un incremento en la proporción de células MTS20⁺ tanto en los cultivos WT como en los mutantes, al compararlos con los cultivos establecidos con ellos (FTOC sin 2'-dGuo). (B) Consecuentemente, la ausencia de timocitos produce en todas las condiciones experimentales una reducción en la proporción de células MTS20⁻ al compararla con los cultivos que crecían en presencia de ellos. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 FTOCs analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Cuando empleábamos lóbulos tímicos mutantes el resultado fue similar al observado con lóbulos WT (Fig. 182A, B), aunque el efecto de la falta de timocitos parecía más evidente en timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-} que en los EphB2^{-/-}, posiblemente debido a que estos últimos presentaban una mayor proporción de células MTS20⁺ inicial. Por otro lado, observábamos que, tanto en ausencia como en presencia de 2'-dGuo, el porcentaje de células inmaduras MTS20⁺ (Fig. 183A) era significativamente mayor, y en consecuencia menor el de MTS20⁻ (Fig. 183B), en los FTOC EphB2^{-/-}, EphB2LacZ y EphB3^{-/-} cuando comparábamos con los valores WT. Únicamente existieron diferencias entre mutantes en los cultivos en ausencia de 2'-dGuo, donde los lóbulos EphB2^{-/-} tenían una mayor proporción de células MTS20⁺ y menor de MTS20⁻. Sin embargo, en los cultivos con 2'-dGuo no existieron diferencias entre los lóbulos mutantes analizados. Es obvio, que en el caso de los FTOCs WT tratados con 2'-dGuo sólo falta la señalización Eph/ephrina debida a interacciones timocitos-TEC, mientras que en los mutantes, además de estas señales, faltan aquellas establecidas entre TEC y TEC.

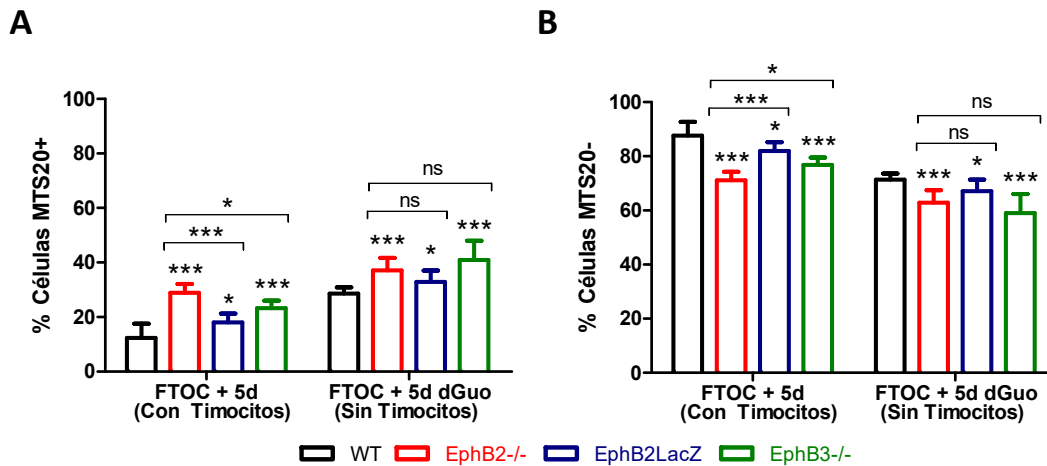


Figura 183. La ausencia de señalización mediada por EphB induce acumulación de células inmaduras MTS20⁺ en presencia y ausencia de timocitos respecto a los timos WT, donde sí hay señalización. Lóbulos tímicos fetales WT y deficientes en EphB de 13.5F fueron puestos en cultivo organotípico durante 5 días en presencia o ausencia de 2'-dGuo (sin y con timocitos, respectivamente) analizándose la proporción de células MTS20⁺ (A) y MTS20⁻ (B) dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻. (A) Los timos mutantes, donde no hay señalización mediada por EphB, tanto en presencia de timocitos, como en ausencia de éstos, aunque mayor en este último caso, presentan mayor porcentaje de MTS20⁺. (B) Consecuentemente, los timos mutantes presentan menor porcentaje de células MTS20⁻, más evidente cuando hay ausencia de timocitos. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 FTOCs analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Para confirmar la importancia de la señalización Eph/ephrina-B en el control de las interacciones homotípicas entre células epiteliales que puedan afectar también la maduración de las células MTS20⁺, llevamos a cabo otro ensayo donde lóbulos WT de 13.5F alinoides fueron tratados con hIgG, EphB2-Fc o ephrina-B1Fc durante 5 días. En estos experimentos, una vez que los timocitos habían sido eliminados del lóbulo, y con ello habían desaparecido las interacciones timocitos-TECs, procedíamos a bloquear la señalización mediada por Eph/ephrina-B solamente entre células epiteliales. Cuando analizamos el porcentaje de células epiteliales inmaduras MTS20⁺ existentes en las diferentes condiciones experimentales, observábamos que en los lóbulos tratados con EphB2-Fc o ephrina-B1Fc había un aumento en la proporción de las células MTS20⁺ (Fig. 184A) respecto de los lóbulos control. Este dato correlacionaba con un descenso en la proporción de células MTS20⁻ (Fig. 184B). Por tanto, este resultado demostraba que la señalización Eph/ephrina-B establecida entre células epiteliales también regulaba la maduración de las células inmaduras.

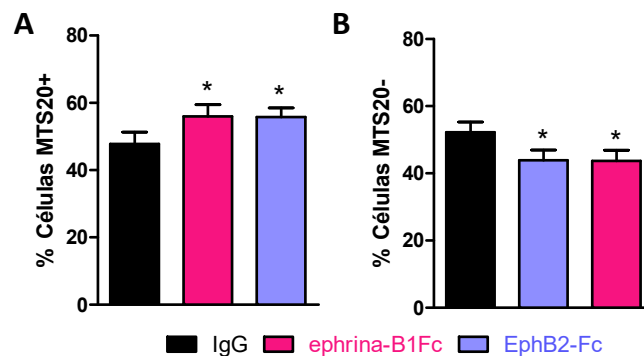


Figura 184. Las interacciones homotípicas TEC-TEC mediadas a través de Eph/ephrina-B controlan la maduración de las células epiteliales inmaduras MTS20⁺. Lóbulos tímicos fetales de 13.5F alinfoideos fueron cultivados durante 5 días en presencia de las proteínas de fusión ephrina-B1Fc o EphB2-Fc utilizando como control inmunoglobulinas G humanas (hIgG). Tras 5 días de cultivo, se analizó la proporción de células MTS20⁺ (A) y MTS20⁻ (B) dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻. (A) Las gráficas muestran un incremento significativo en la proporción de células MTS20⁺ tras el tratamiento con ephrina-B1Fc o EphB2-Fc, que se traduce en una reducción en la proporción de células MTS20⁻ (B), al comparar con la condición control. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 5 FTOCs analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$, según el análisis estadístico de la t de Student.

En resumen, la falta de señales EphB/ephrina-B entre timocitos y TECs debida a la falta de las moléculas, al bloqueo de la señalización por proteínas de fusión o a la ausencia de timocitos produce un retraso en la maduración de TECs inmaduras MTS20⁺, mayor cuando además de las interacciones Eph/ephrina-B entre timocitos y TECs, faltan las mediadas entre TECs. Tomando en conjunto todos estos resultados, podemos concluir que la acumulación de células MTS20⁺ en el timo de ratones deficientes en EphB es consecuencia de varios factores. Por un lado, un menor número de timocitos (CD45⁺) y por otro, una incorrecta interacción de éstos con las células epiteliales, pero también por una incorrecta interacción entre sí de las células epiteliales mutantes.

3.2. Ensayos con células *nurse*

Sobre la base de la posible relevancia de las interacciones T-TEC en los fenotipos encontrados en los timos deficientes en EphB que apuntábamos en el apartado anterior, consideramos que un modelo adecuado para su estudio era el que representan las llamadas células *nurse*. Como mencionamos en la Introducción del presente trabajo, el timo es un órgano linfoide primario implicado en la generación de un repertorio de receptores T específicos mediante procesos de selección positiva y negativa. En estos procesos las interacciones entre timocitos y TECs juegan un papel

esencial, por lo que el desarrollo de modelos experimentales que mimetizaran dichas interacciones fueron siempre considerados de gran utilidad. Uno de esos modelos es el que constituye una subpoblación de células epiteliales denominadas células *nurse* (TNC) que fueron consideradas un microambiente especializado *ex vivo* para la maduración de las células T inmaduras (Hendrix y cols., 2010). Este tipo de células fueron descritas originariamente en el timo de ratón y, posteriormente, en el de otras especies; se caracterizan por formar complejos linfoepiteliales en el que una única célula epitelial engloba entre 7 y 50 timocitos, mediante invaginaciones de su membrana plasmática, contribuyendo a su maduración (Hendrix y cols., 2010). Constituyen, por tanto, un excelente modelo *in vitro* para analizar si la formación de tales complejos linfoepiteliales está alterada de alguna forma, cualitativa o cuantitativamente en timos deficientes en EphB y, por tanto, profundizar en la relevancia que las interacciones timocitos-TEC tienen en los fenotipos observados en dichos timos.

Fenotípicamente, la mayoría de las TNC son células epiteliales $K8^+K5^-$ o bien $K8^+K5^+$, pero no $K8^-K5^+$ (Hendrix y cols., 2010; Chilukuri y cols., 2014), que expresan el marcador pH91 y parecen ocupar *in situ* el borde córtico-medular (Hendrix y cols., 2010). Para el aislamiento de las TNC seguimos el protocolo desarrollado originalmente por Wekerle y colaboradores (Wekerle y cols., 1980) tal y como hemos descrito en el Apartado 3.4 (Material y Métodos), empleando timos procedentes de ratones de 1 mes de edad y, en su caracterización analizamos nuevos marcadores epiteliales corticales y medulares. Nuestros resultados mostrados en la **Figura 185** indicaban que las células *nurse*, identificadas como células PanCK⁺ con varios núcleos en su interior (Hoechst⁺), expresaban marcadores corticales (Ly51, DEC205, CD40) y MHCII (**Fig. 186**). Sin embargo, no expresaban marcadores típicos del epitelio medular MTS10, ni MTS20 característico de células inmaduras (**Fig. 186**), confirmando que estas células no expresaban K5. Estos resultados, por lo tanto, confirmaron que las células *nurse* son células con fenotipo básicamente cortical.

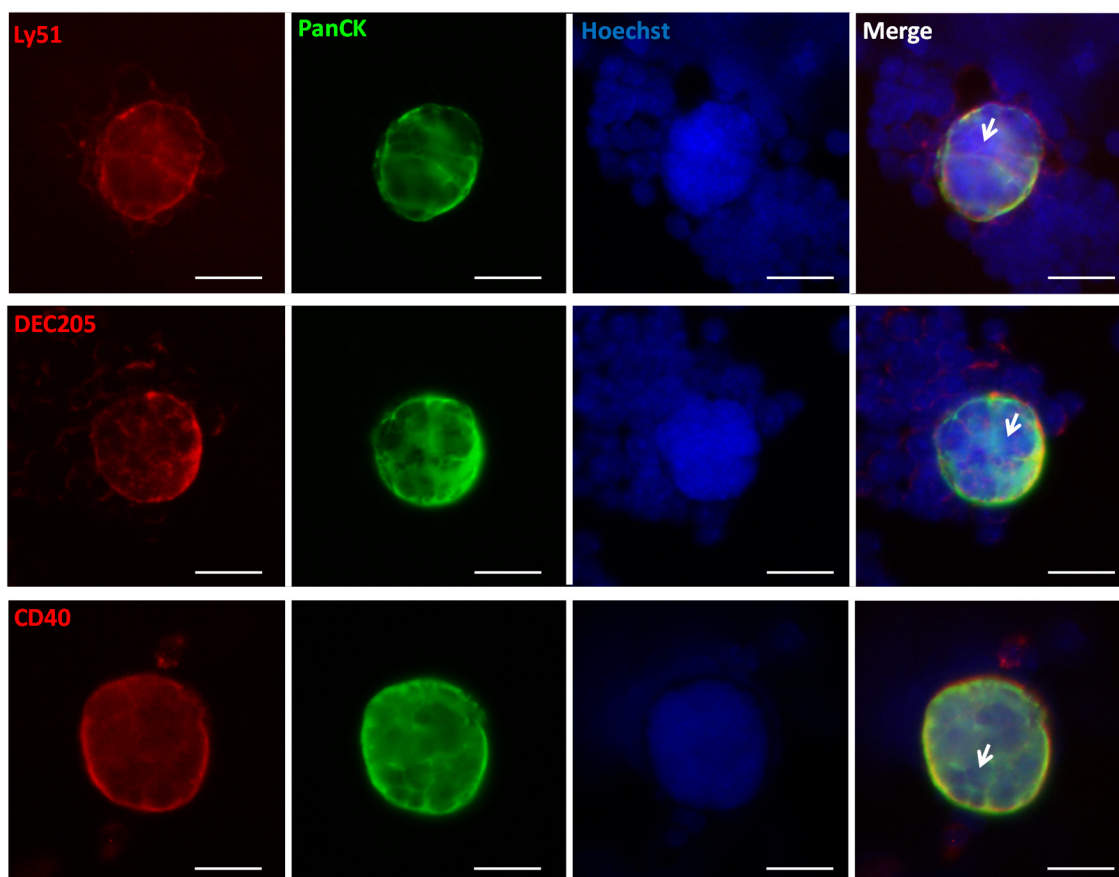


Figura 185. Caracterización fenotípica de las células epiteliales tímicas *nurse* (complejos linfoepiteliales). Citocentrifugaciones de suspensiones celulares enriquecidas en células *nurse* fueron teñidas con anticuerpos anti-PanCK, anti-Ly51, anti-DEC205 y anti-CD40. Los complejos linfoepiteliales fueron seleccionados en base a la expresión de PanCK (verde) y a la presencia en su interior de varios núcleos celulares (azul, Hoechst 33342). Nótese la expresión en ellos de Ly51, DEC205 y CD40 (rojo). La flecha señala un timocito englobado en la célula *nurse*. Las imágenes son representativas de tres aislamientos realizados. Escala: 20 μ m.

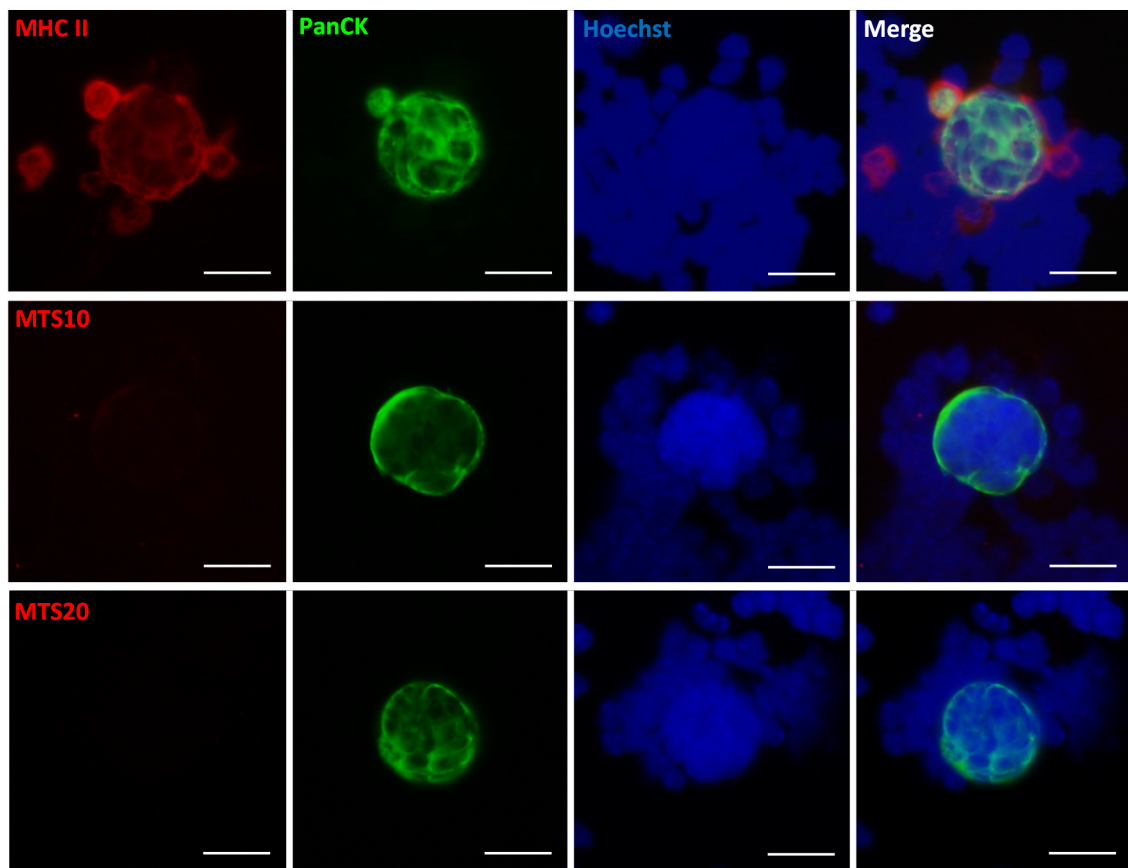


Figura 186. Caracterización fenotípica de las células epiteliales tímicas *nurse* (complejos linfoepiteliales). Citocentrifugaciones de suspensiones celulares enriquecidas en células *nurse* fueron teñidas con anticuerpos anti-PanCK, anti-MHCII, anti-MTS10 y anti-MTS20. Los complejos linfoepiteliales fueron seleccionados en base a la expresión de PanCK (verde) y a la presencia en su interior de varios núcleos celulares (azul, Hoechst 33342). Nótese la expresión en ellos de moléculas para MHCII, pero no para el marcador medular MTS10 (rojo) y el marcador de células epiteliales inmaduras MTS20 (rojo). Las imágenes son representativas de tres aislamientos realizados. Escala: 20µm.

Analizamos también sí, como hace *in situ* el epitelio cortical, las TNCs y los timocitos que englobaban, expresaban las Eph y ephrinas objeto de este estudio, dada la relevancia de estas moléculas en las interacciones célula-célula. Como puede verse en la **Figura 187**, tanto EphB2 como EphB3 y sus ligandos ephrina-B1 y ephrina-B2 se expresaban en estos complejos tanto en la célula *nurse* como en los timocitos que albergaba en su interior (Hoechst⁺).

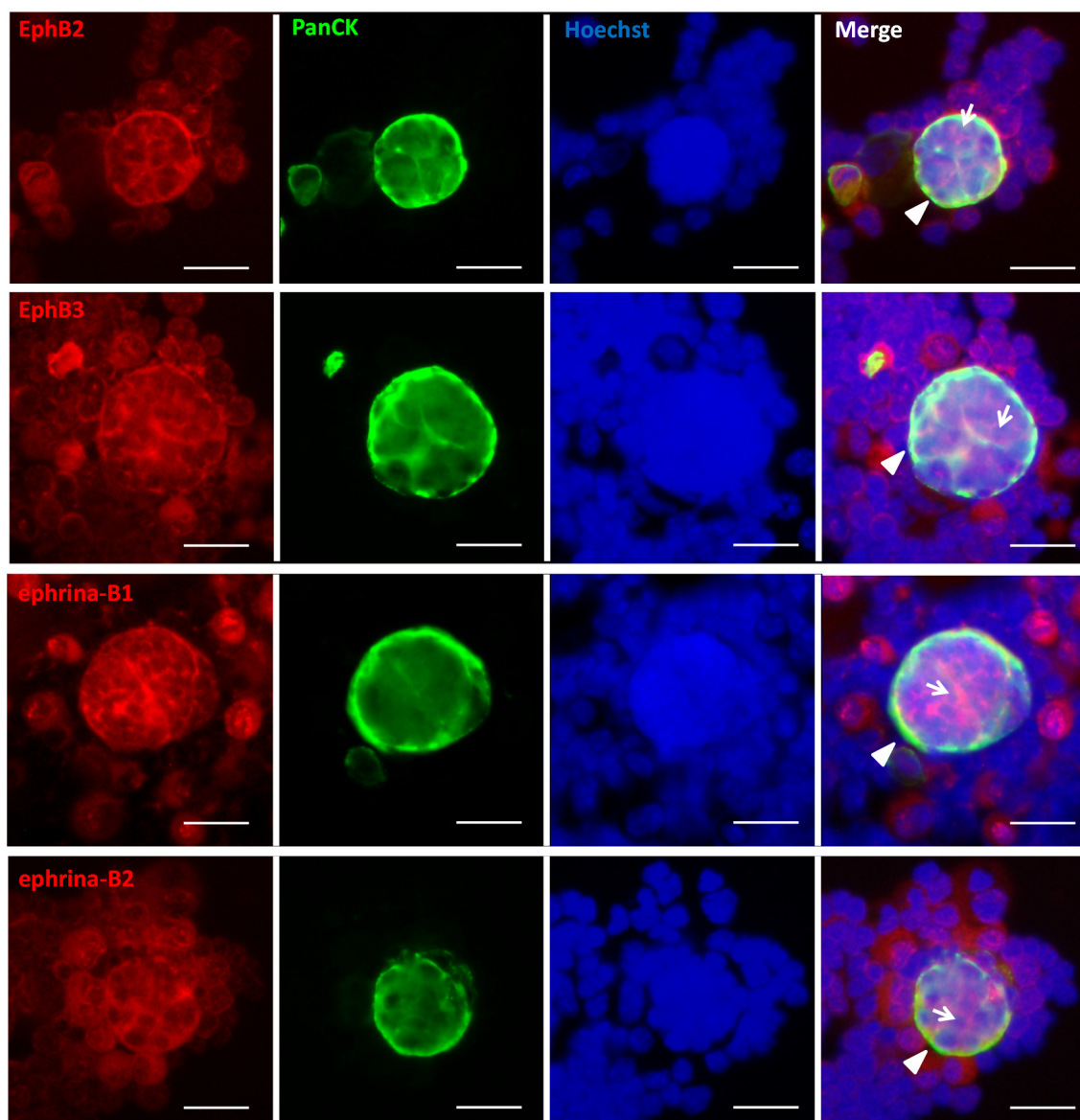


Figura 187. Expresión de EphB2, EphB3, ephrina-B1 y ephrina-B2 en células tímicas *nurse* (complejos linfoepiteliales). Citocentrifugaciones de suspensiones celulares enriquecidas en células *nurse* fueron teñidas con anticuerpos anti-EphB2, anti-EphB3, anti-ephrina-B1 y anti-ephrina-B2. Los complejos linfoepiteliales fueron seleccionados en base a la expresión de PanCK (verde) y a la presencia en su interior de varios núcleos celulares (azul, Hoechst 33342). La flecha señala la expresión de Eph o ephrina en los timocitos y las cabezas de flecha en la célula *nurse*. Las imágenes son representativas de tres aislamientos realizados. Escala: 20μm.

La expresión de Eph y ephrinas-B en los complejos linfopiteliales sugería, pero no demostraba, que quizás estas moléculas podrían participar en su formación y, por tanto, la falta de EphB2 o EphB3 podría afectar a su formación y/u organización. Para analizar estos aspectos, estudiamos en primer lugar la proporción de complejos obtenidos después de su enriquecimiento a partir de suspensiones de timo total procedentes de ratones de 1 mes de edad, partiendo inicialmente del mismo número de células tímicas totales (150×10^6 células), tanto WT como mutantes. En los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} la proporción de células *nurse* (complejos linfopiteliales) tras el aislamiento era menor al comparar con los valores WT, sin embargo, en el caso de los timos EphB2LacZ su proporción fue significativamente más alta (**Fig. 188**).

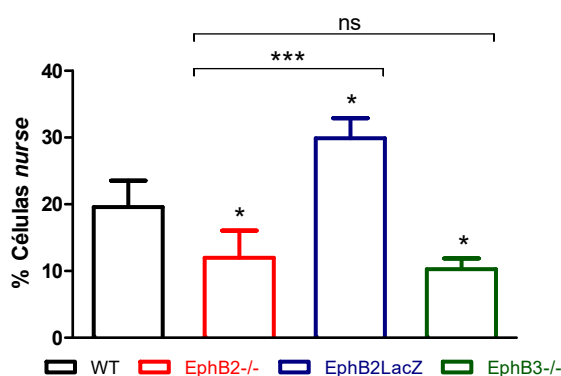


Figura 188. Proporción de células *nurse* (complejos linfopiteliales) en el timo de ratones de un mes de edad WT y deficientes en EphB. La gráfica muestra la proporción de células *nurse* tras su enriquecimiento partiendo de la población tímica total en el timo de animales WT y mutantes. Nótese como en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} la proporción de estas células disminuye significativamente, mientras que los timos EphB2LacZ muestran un incremento significativo de ellas con respecto a los valores WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 3 aislamientos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Este resultado demostraría que las EphB en estudio estarían de alguna manera implicadas en la formación de estos complejos linfopiteliales, de tal modo que la falta de señalización *forward* y *reverse* mediada a través de EphB2 o EphB3 provoca menor formación de los mismos, mientras que la recuperación de la señal *reverse* mediada por EphB2 en los timos EphB2LacZ incrementaba su número.

Como hemos comentado anteriormente estos complejos linfopiteliales contienen un número variable (entre 7 y 50) de timocitos (Hendrix y cols., 2010). Puesto que, los receptores EphB están implicados en las interacciones timocitos-TEC, estudiamos si existían diferencias en el número de timocitos que albergaban las células *nurse* provenientes de ratones mutantes. Para ello, realizamos citocentrifugaciones (CTC) de suspensiones celulares enriquecidas en células *nurse* procedentes de timos WT y

mutantes partiendo del mismo número de células totales al iniciar el aislamiento. La identificación de los complejos linfopiteliales se llevó a cabo mediante el empleo de un anticuerpo anti-PanCitoqueratina (PanCK) en combinación con el anticuerpo anti-CD45 para identificar en este último caso a los timocitos. Se identificó como células *nurse* (complejos linfopiteliales) positivas aquellas que tenían en su interior células CD45⁺ y que eran PanCK⁺. Para determinar el número de timocitos que contenían las células *nurse* se analizaron 30 complejos linfopiteliales al azar en todas las condiciones (WT y mutantes) a partir de 3 aislamientos independientes. Inicialmente con las células WT observamos que existían diferentes complejos en función del número de timocitos que contuvieran (**Fig. 189**), agrupándose así en: 1-5, 6-10, 11-15, 16-20 y más de 21.

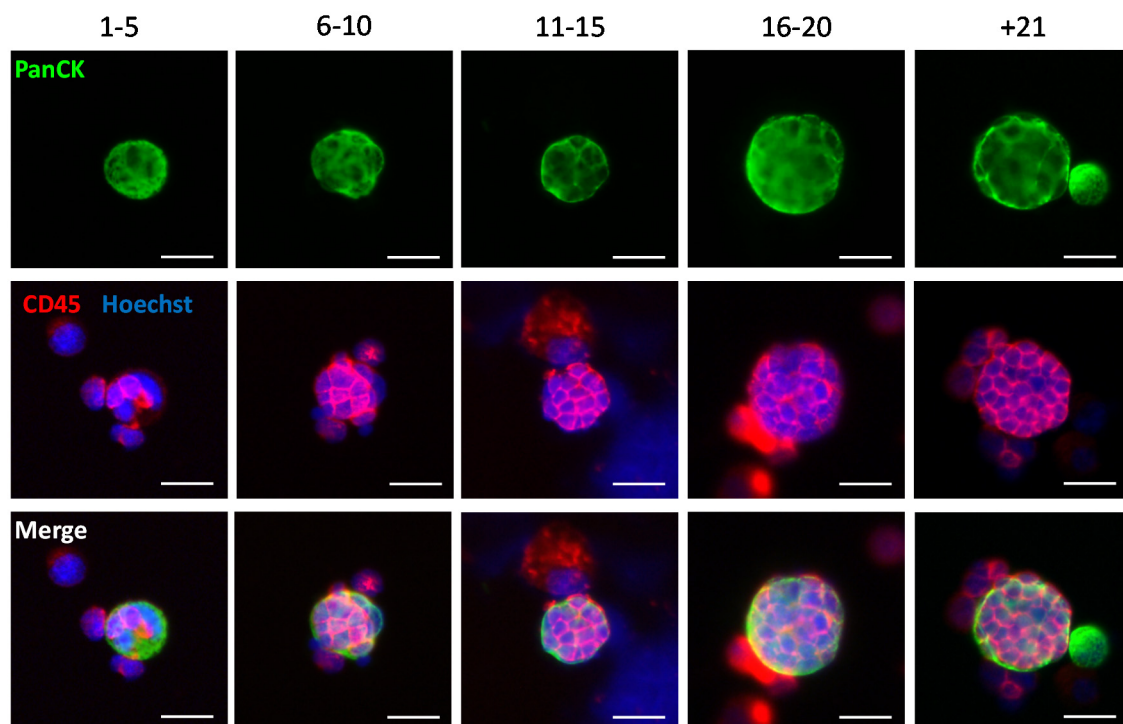


Figura 189. Distintos tipos de complejos linfopiteliales existentes en el timo adulto. Citocentrifugaciones de suspensiones celulares enriquecidas en células *nurse* fueron teñidas con los anticuerpos anti-PanCK, anti-CD45 y Hoechst 33342. El análisis inmunofluorescente revela la existencia de diferentes complejos linfopiteliales en función del número de células CD45⁺ que contengan, estableciéndose los siguientes grupos: 1-5; 6-10; 11-15; 16-20 y más de 21 (+21). Las imágenes muestran un complejo tipo de cada grupo. Escala: 20μm.

El complejo mayoritario en las muestras WT contenía entre 6-10 timocitos y este tipo representaba aproximadamente el 50% de todos los complejos analizados (**Fig. 190**), mientras que el menos representado era el que contenía más de 21 timocitos. El resto de rangos mostraron una representación bastante similar (**Fig. 190**). Cuando analizábamos las muestras obtenidas en timos mutantes observamos que la distribución de los diferentes complejos era similar a la descrita en los WT, pero sin embargo, en todos ellos había una reducción significativa en la formación del complejo mayoritario (6-10), sin observar diferencias significativas en el resto de los grupos (**Fig. 190**).

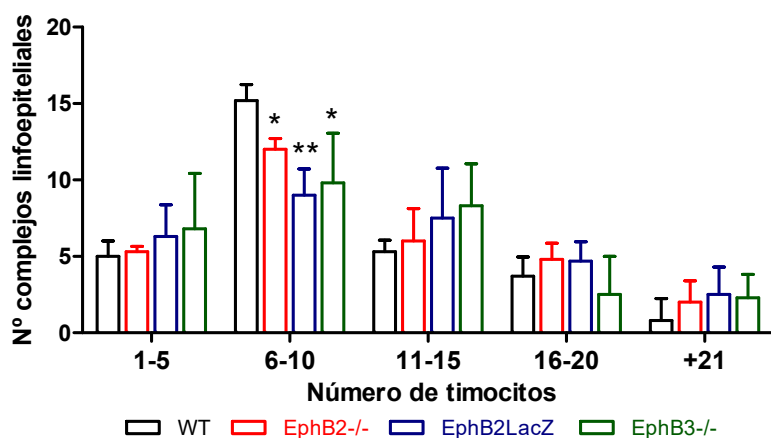


Figura 190. Distribución del número de complejos linfopiteliales en los timos WT y deficientes en EphB. La gráfica muestra la distribución del número de los distintos complejos linfopiteliales existentes en el timo adulto de un total de 30 complejos analizados. Nótese como la distribución en los timos mutantes es similar a la de los timos WT, sin embargo, en todos los mutantes existe una menor proporción de los complejos linfopiteliales que contenían entre 6-10 timocitos. No se observan diferencias en el resto de grupos establecidos. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 3 aislamientos realizados partiendo del mismo número de células iniciales. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ según el análisis estadístico de la t de Student.

Estos resultados demostrarían nuevamente que la señalización Eph/ephrina-B está implicada en la formación de complejos linfopiteliales, afectando las interacciones timocitos-TECs.

3.3. Cambios en la morfología de las TECs dificultan previsiblemente las interacciones T-TECs en timos deficientes en EphB

3.3.1. Alteraciones en la señalización EphB2 o EphB3 reproducen la morfología de las TECs mutantes

De acuerdo con los resultados descritos en los dos apartados anteriores, consideramos que a la vista de la morfología de los timos adultos deficientes en EphB (*García-Ceca y cols., 2009a*), las alteraciones sufridas por el epitelio podrían afectar, al menos parcialmente, las interacciones T-TEC importantes en estos mutantes para alcanzar un fenotipo normal. Efectivamente ya hemos descrito como la falta de EphB2 o EphB3 inducía cambios específicos en la morfología de las TECs tanto corticales como medulares (*García-Ceca y cols., 2009a*). Algunas células medulares de la población mayoritaria $K5^+K8^-MTS10^+$ y las células de fenotipo inmaduro $K5^+K8^+MTS10^+$ en los ratones deficientes en EphB2 o EphB3 mostraban unos procesos celulares más cortos, adquiriendo una morfología globular (**Fig. 191A**). En el caso de las células corticales, los fenotipos observados eran específicos de cada EphB ausente. Así, las TEC corticales EphB2^{-/-} mostraban una reducción en la longitud de los procesos celulares lo que les confería una morfología más acortada y redondeada (**Fig. 191B**); mientras que la falta de EphB3 se traducía en células con procesos alargados (**Fig. 191B**), generalmente dispuestos en perpendicular a la cápsula tímica, y que carecían aparentemente de prolongaciones perpendiculares al eje central. En ambas condiciones, las TECs aparecían mucho más separadas entre sí y de los timocitos que en los timos WT.

Por todo ello, para evaluar si la falta de señales mediadas por EphB2 o EphB3 alteraba la morfología del epitelio tímico de manera que pudiera verse dificultada su interacción con los timocitos vecinos, seguimos el mismo protocolo utilizado para el análisis de la expansión de la médula tímica antes descrito (ver Apartado 1.6.4.).

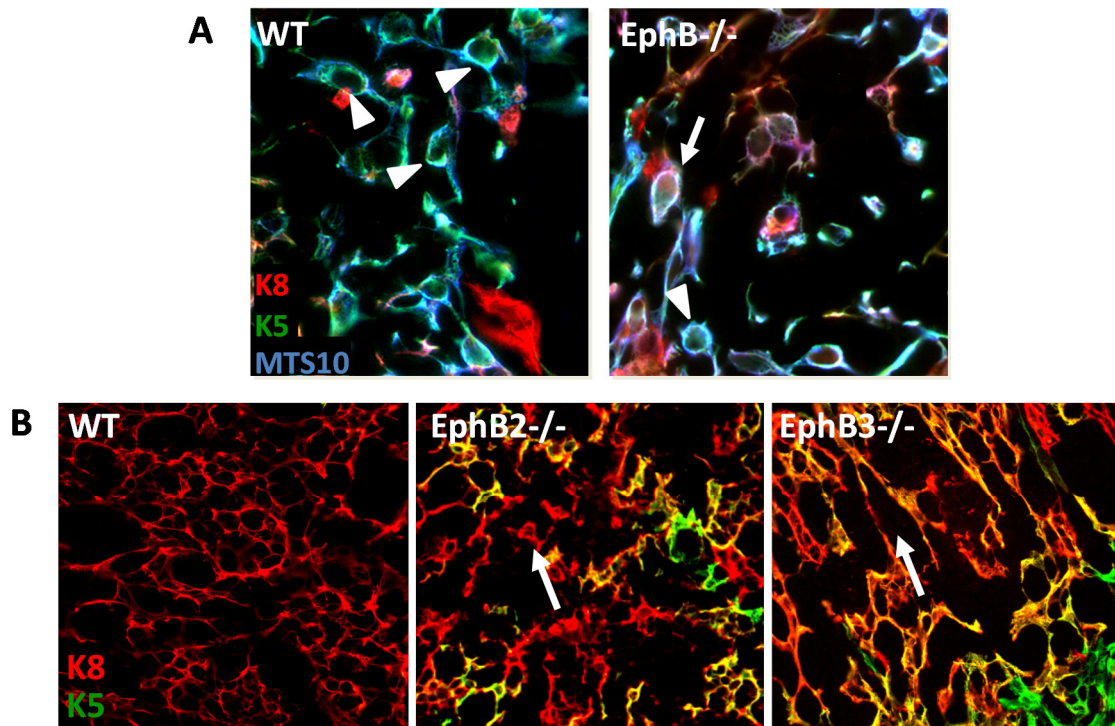


Figura 191. Morfología de las células epiteliales medulares y corticales en timos adultos WT y deficientes en EphB2 o EphB3. (A) Las imágenes muestran un detalle de la morfología de las células epiteliales medulares *in situ* en los timos deficientes en EphB. Nótese la morfología globular por pérdida de los procesos celulares en las células K5⁺K8⁺MTS10⁺ (cabeza de flecha) y K5⁺K8⁺MTS10⁺ (flecha). **(B)** Morfología de las células epiteliales corticales de timos EphB2^{-/-}, donde se observa una reducción de la longitud de los procesos celulares y la adquisición de una morfología más redondeada (flecha), mientras que la falta de EphB3 cursa con una mayor longitud de los procesos celulares y una pérdida de las proyecciones perpendiculares al eje central (flecha). Imágenes adaptadas de la Tesis Doctoral de Javier García-Ceca, 2007.

Tal y como muestra la **Figura 192**, los cultivos mantenidos con anticuerpos anti-EphB2 (**Fig. 192B**) o anti-EphB3 (**Fig. 192C**) tras 24 horas de cultivo mostraban alteraciones en la organización de la red epitelial total identificada con un anticuerpo anti-PanCK. En estos cultivos había aparentemente una menor densidad de células epiteliales, al comparar con los controles de isotipo (**Fig. 192A**), a pesar de que todos ellos se realizaron empleando el mismo número de células tímicas totales (3×10^5 células) obtenidas a partir de lóbulos WT disgregados. Analizando la morfología de las TECs a mayor detalle tras los diferentes tratamientos (**Fig. 192D, E, F** e inserto), comprobamos que en los cultivos establecidos con el control de isotipo (**Fig. 192D**) se asemejaba más a la condición *in situ*, que aquellos que recibían el tratamiento con anti-EphB2 (**Fig. 192E**) o anti-EphB3 (**Fig. 192F**), si bien en ninguno de los tres casos la morfología era exactamente igual a la observada en las secciones histológicas. En el primero de los casos, las células mostraban una morfología peor definida, mientras que en el

segundo, muchas de las células, pero no todas, mostraban TECs con procesos celulares alargados, por lo que podemos asumir que ambos tratamientos reprodujeron parcialmente el fenotipo observado en los timos mutantes EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}.

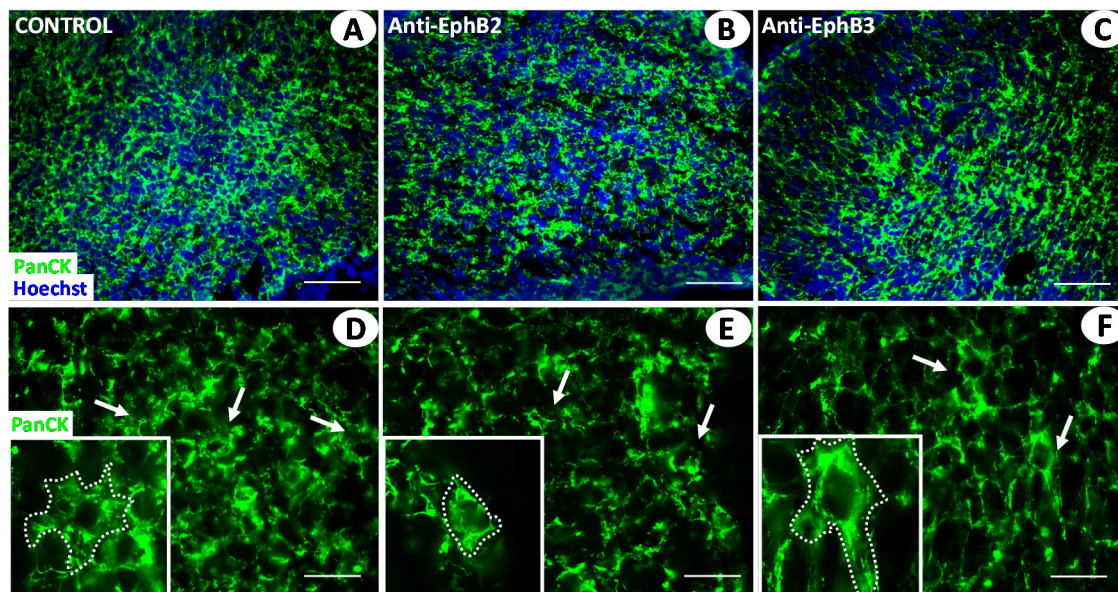


Figura 192. Organización histológica y morfología de las células epiteliales tímicas WT en reagregados establecidos en presencia de anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3. (A, B y C) Organización histológica de la red epitelial tímica (PanCK⁺) en reagregados establecidos con el control de isotipo (A). Nótese la menor densidad de células epiteliales en los reagregados establecidos con anticuerpos anti-EphB2 (B) o anti-EphB3 (C). (D, E y F) Las imágenes muestran la morfología de las células epiteliales en los reagregados mantenidos con el control de isotipo (D); o tratados con los anticuerpos anti-EphB2 (E) lo que resulta en células epiteliales más redondeadas; el tratamiento con anticuerpos anti-EphB3 (F) se traduce en, al menos, algunas células con procesos más alargados. El inserto muestra un detalle representativo de los tipos celulares anteriormente descritos. Escala: A, B y C: 100µm; D, E y F: 50µm.

Examinamos también lóbulos WT, EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} sin ningún tipo de tratamiento. La idea era que si la morfología se debía a la falta de señalización mediada por EphB2 o EphB3, ésta debería ser igual en los cultivos WT tratados con los anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 y en aquellos derivados de timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} respectivamente, puesto que en los mutantes también faltarían las señales transmitidas a través de la correspondiente EphB.

En la **Figura 193**, se observa como las TECs en los cultivos establecidos con células deficientes en EphB2 o EphB3 mostraron una morfología similar a la de los cultivos establecidos con células WT tratadas con anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 (**Fig. 192**). Este resultado confirmaría indirectamente, al menos parcialmente, la interrupción en la señalización EphB tras el tratamiento con los anticuerpos correspondientes.

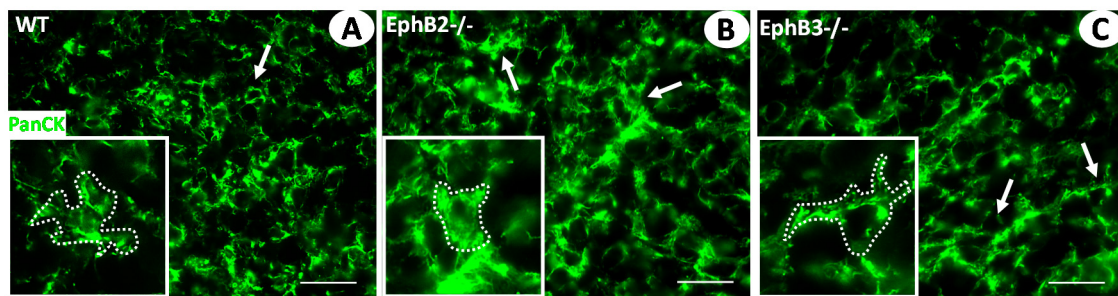


Figura 193. Morfología de las células epiteliales tímica presentes en reagregados establecidos con células WT o deficientes en EphB. (A, B y C) Las células epiteliales tímica de RTOC establecidos con células EphB2-/- mostraban una morfología más redondeada (**B**) mientras que aquellas presentes en reagregados formados por células EphB3-/- eran más alargadas (**C**) al compararlos con las células WT (**A**). Los insertos muestran un detalle representativo de la morfología de estas células. Escala: 50µm.

Con el fin de cuantificar estos cambios observados en la morfología de las TECs con cada uno de los tratamientos y de las células mutantes realizamos un análisis morfométrico de la longitud de los procesos celulares observados en ellas. A pesar de los problemas para la realización de este análisis debido a la dificultad para identificar claramente en dos dimensiones los procesos celulares de las células epiteliales (PanCK⁺), seleccionamos las mejores células definidas según su núcleo celular y sus procesos. En estas células, se midió la longitud de los procesos celulares desde la periferia del núcleo hasta los extremos de los procesos tal y como se representa en la **Figura 194A**. Los datos mostrados en la **Figura 194B** y **C** indican la longitud de los procesos epiteliales medidos en píxeles en los cultivos establecidos con los anticuerpos anti-EphB2 o anti-EphB3 (**Fig. 194B**) o empleando células mutantes (**Fig. 194C**). En el primero de los casos, realizamos tres reagregados en total de cada tipo analizando alrededor de 15 células/reagregado, con un rango de procesos totales medidos de entre 60 y 90. En los cultivos establecidos con células mutantes, también realizamos tres reagregados de cada tipo analizando alrededor de 20 células/reagregado con un número de procesos totales evaluados de entre 90 y 150. A diferencia de lo observado en los controles de isotipo, los procesos epiteliales en los cultivos tratados con anti-EphB2 mostraban una reducción significativa en su longitud (**Fig. 194B**), mientras que el tratamiento con anti-EphB3 resultó en una longitud significativamente mayor de los mismos (**Fig. 194B**), existiendo diferencias significativas entre ambos tipos de tratamientos. Similares resultados se obtuvieron empleando células deficientes en EphB2-/- o EphB3-/- con respecto a los establecidos con células WT (**Fig. 194C**), donde de nuevo existieron diferencias entre los cultivos EphB2-/- y EphB3-/-.

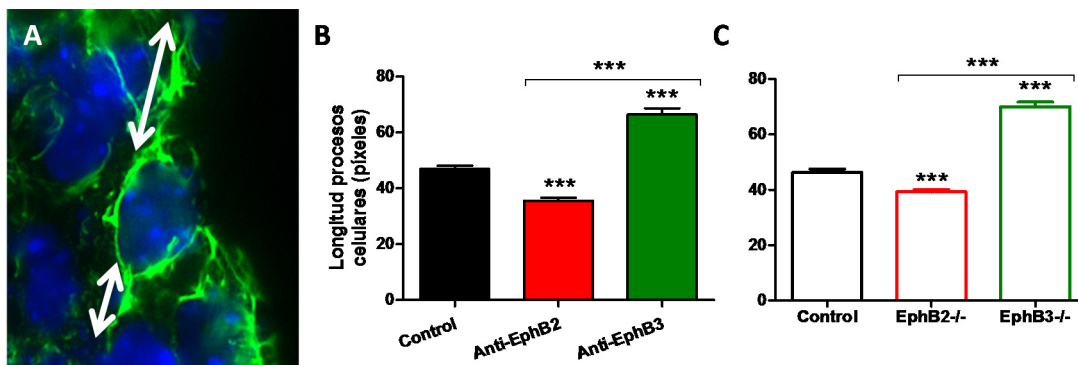


Figura 194. Análisis morfométrico de la longitud de los procesos celulares epiteliales observados en RTOCs tratados con anticuerpos anti-EphB, así como en RTOCs establecidos con células deficientes en EphB. (A) Identificación de los procesos celulares desde la periferia del núcleo hasta los extremos de los procesos (flechas). (B) La gráfica muestra como el tratamiento con anticuerpos anti-EphB2 reduce la longitud de los procesos celulares, como se observaba en los RTOC EphB2^{-/-} (C) al comparar con sus respectivos controles; mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-EphB3 (B) resulta en procesos celulares más largos similares a los observados en los RTOC EphB3^{-/-} (C). Los datos corresponden a 3 tipos de RTOCs para cada una de las condiciones. Los valores representan la media (\pm SD) de los diferentes procesos evaluados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la t de Student.

3.4. Alteraciones en la comunicación T-TEC mediada por EphB afectan el desarrollo del epitelio medular

Siguiendo la misma argumentación que en el apartado anterior, alteraciones en la comunicación T-TECs podrían deberse también a la falta de cualquier población linfóide conocida por su implicación en la maduración del epitelio tímico. Elegimos para esta parte de nuestro estudio, el análisis de dos elementos implicados en la maduración del epitelio medular durante el periodo embrionario, las células $V\gamma 5^+$ y el par RANK-RANKL.

3.4.1. Presencia de células $V\gamma 5^+$ en timos deficientes en EphB

Como se ha descrito extensamente en la Introducción de este trabajo, la maduración funcional de timocitos y TECs requiere de señales moleculares transmitidas a través de interacciones entre células del estroma tímico, principalmente TECs, y células linfoides, principalmente timocitos. En el caso de la maduración medular, está ampliamente documentado el papel jugado por moléculas de la familia TNF y sus receptores. Particularmente importante es la vía de señalización RANK/RANKL que inicia la formación y maduración de TECs medulares, dos procesos que como estamos viendo están profundamente alterados en los mutantes deficientes en EphB. En el timo

adulto, la activación de la vía RANK/RANKL está mediada por timocitos SP CD4⁺ seleccionados positivamente (Klein y cols., 2014), pero en el timo embrionario, donde no existen todavía tales timocitos, parece que este proceso está regulado por células inductoras linfoides (LTi) y células T canónicas V γ 5⁺ que promueven la maduración de TECs inmaduras CD80⁻AIRE⁻ a células maduras CD80⁺AIRE⁺ (Roberts y cols., 2012).

Nuestros resultados han mostrado en conjunto un retraso en la aparición de subpoblaciones epiteliales medulares maduras definidas por la expresión de marcadores como UEA1, CD80 y AIRE, así como una acumulación de los progenitores medulares Cld3,4^{hi}SSEA1⁺ en estadios tempranos del desarrollo (14.5F) o de MTS20^{hi}Cld3,4^{hi}. Podría pensarse que este retraso en la maduración podría deberse a la falta de señales inductoras de la misma y/o de las células que las producen durante el desarrollo embrionario. Por ello, analizamos si había alteraciones en los porcentajes de células CD45RB⁺V γ 5⁺ de timos mutantes lo que podría afectar a la aparición de las células medulares AIRE⁺ y explicar, al menos parcialmente, el retraso de la maduración epitelial encontrado.

Determinamos por citometría de flujo la proporción de células CD45RB⁺V γ 5⁺, dado que las células DETC V γ 5⁺ (*dendritic epidermal T cells*) expresan CD45RB, un marcador de

maduración de los progenitores intratímicos DETC (Roberts y cols., 2012) a 15.5F en el timo WT (Fig. 195). Como se muestra en la

Figura 196, la proporción de células CD45RB⁺V γ 5⁺ en los

timos WT era muy baja a 15.5F (2.71% del total celular tímico). Cuando analizábamos la proporción de las células CD45RB⁺V γ 5⁺ en los timos deficientes en EphB observábamos como todos ellos tenían valores más bajos con respecto a los valores WT, pero de manera significativa únicamente en los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-} (Fig. 196). Por otro lado, al comparar entre mutantes los timos EphB2^{-/-} tenían valores significativamente mayores que los EphB2LacZ y EphB3^{-/-} (Fig. 196).

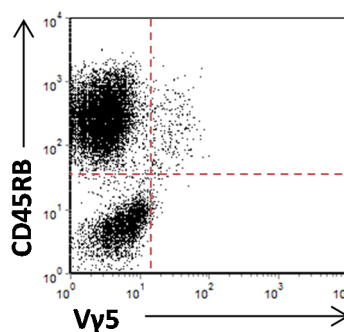


Figura 195. Identificación de la población celular CD45RB⁺V γ 5⁺ en timos WT 15.5F. A partir de la población tímica total se identificó la población CD45RB⁺V γ 5⁺ en base a la expresión de los marcadores CD45RB y V γ 5. El dot plot es un ejemplo representativo de los timos analizados.

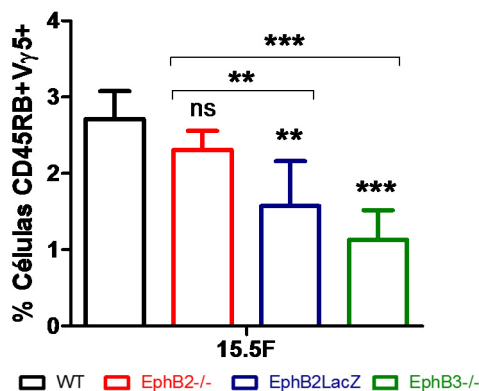


Figura 196. Proporción de células CD45RB⁺Vγ5⁺ a 15.5F en timos WT y deficientes en EphB. La proporción de células CD45RB⁺Vγ5⁺ es menor en todos los timos mutantes, pero significativamente únicamente en los EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Al comparar entre mutantes, los timos EphB2^{-/-} presentan valores significativamente mayores que los EphB2LacZ y EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

3.4.2. Papel de la vía RANKL

Continuando con la argumentación explicada en el apartado anterior, estudiamos la expresión de RANKL en las células Vγ5⁺, implicadas en la maduración del epitelio medular a través del par RANK-RANKL. Nos planteamos si alteraciones en esta ruta de señalización podría contribuir al retraso de la maduración del epitelio medular de los timos deficientes en EphB. Naturalmente, tales defectos podrían deberse a varias causas, no excluyentes entre sí: baja expresión de RANKL en los timocitos o de RANK en las TECs, o a los ya mencionados defectos en las interacciones timocitos-TECs necesarios para la interacción RANKL-RANK o a defectos en la respuesta de RANK en las células epiteliales tras la interacción con su ligando.

Inicialmente determinamos en timos WT y mutantes de 15.5F la proporción de células CD45RB⁺Vγ5⁺ (Vγ5⁺) que expresan RANKL mediante citometría de flujo y de RANK en las células epiteliales aisladas mediante qPCR. Al analizar la expresión RANKL dentro de la población Vγ5⁺ en los timos WT observamos que aproximadamente el 20% de sus células eran RANKL⁺. Los mutantes mostraban claras diferencias respecto a los valores WT, que dependían del ratón objeto de estudio. Así, en los timos EphB2^{-/-} la proporción de células RANKL⁺ era significativamente más baja que en los WT y en los EphB3^{-/-} significativamente mayores. Por contra, no existían diferencias con los timos EphB2LacZ. Al comparar los valores mutantes, los timos EphB2^{-/-} mostraban un porcentaje significativamente menor de células RANKL⁺ dentro de la población Vγ5⁺ que los EphB2LacZ y que los EphB3^{-/-} (**Fig. 197**).

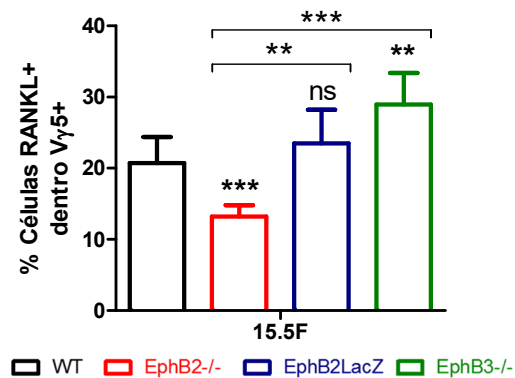


Figura 197. Porcentaje de células RANKL⁺ dentro de la población de timocitos CD45RB⁺Vγ5⁺ en timos WT y deficientes en EphB a 15.5F. La gráfica muestra el porcentaje de células RANKL⁺ por citometría de flujo tanto en timos WT como mutantes dentro de la población CD45RB⁺Vγ5⁺ (Vγ5⁺). Los timos EphB2^{-/-} presentan valores significativamente menores que los WT, y que el resto de mutantes; mientras que los timos EphB3^{-/-} presentan valores significativamente mayores que los WT. No se observan diferencias entre los timos WT y EphB2LacZ. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Puesto que si comparáramos esta **Figura 197** con aquella que muestra la proporción de células CD45RB⁺Vγ5⁺ en la población tímica total (**Fig. 196**), comprobábamos que, por ejemplo, en los timos EphB3^{-/-} a pesar de tener un porcentaje significativamente menor de células CD45RB⁺Vγ5⁺ respecto a los WT, presentaban más células RANKL⁺; mientras que en los timos EphB2^{-/-} la situación era la contraria, el porcentaje de células CD45RB⁺Vγ5⁺ era ligeramente menor que el de los WT pero claramente tenían menos células RANKL⁺, determinamos la proporción total de células CD45RB⁺Vγ5⁺RANKL⁺ tanto en timos WT como en mutantes. Tal y como se muestra en la **Figura 198** la proporción de esta población celular era muy baja tanto en timos WT como mutantes (0.3-0.5%), pero en estos últimos su proporción era significativamente menor respecto a los valores WT (**Fig. 198**), sin diferencias entre ellos.

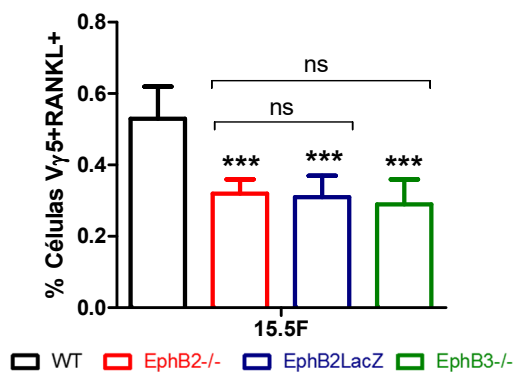


Figura 198. Porcentaje de células Vγ5⁺RANKL⁺ en la población tímica total en timos WT y deficientes en EphB a 15.5F. La gráfica muestra el porcentaje total de células CD45RB⁺Vγ5⁺RANKL⁺ (Vγ5⁺RANKL⁺) en timos WT como mutantes. Todos los timos mutantes presentan valores significativamente menores que los WT. No se observan diferencias significativas entre mutantes. Los datos corresponden a la media (±SD) de, al menos, 5 fetos analizados. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

En resumen, estos resultados demuestran que los timos mutantes fetales presentarían una menor proporción de células RANKL⁺, capaces de interactuar con TEC RANK⁺ lo que podría contribuir al retraso de la maduración del epitelio medular observado en tales timos.

A continuación, determinamos los niveles de expresión de RANK mediante PCR cuantitativa (qPCR) en TECs totales de 15.5F aisladas mediante *sorting* en los timos WT y mutantes. Tal y como se muestra en la **Figura 199**, las células EphB2^{-/-} mostraban valores ligeramente superiores de RANK que los timos WT, mientras en las EphB3^{-/-} eran inferiores y en las células EphB2LacZ similares a los controles. Por otro lado, no se observaron diferencias entre las células EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, pero si una expresión significativamente mayor en las células EphB2^{-/-} que en las EphB3^{-/-}.

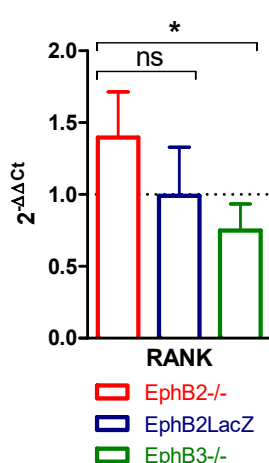


Figura 199. Expresión de RANK mediante PCR cuantitativa (qPCR) en TECs de 15.5F en timos deficientes en EphB respecto a timos WT. La gráfica muestra el nivel de expresión relativa de RANK ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en TECs totales mutantes, aisladas mediante *sorting*, respecto a la expresión WT (valor 1, línea de puntos). Nótese como la expresión en las células EphB2^{-/-} es ligeramente superior, mientras que en los EphB3^{-/-} es inferior, aunque de forma no significativa en ambos casos respecto a los valores control. Sin embargo, cuando se comparan los mutantes entre sí, las células EphB2^{-/-} muestran valores de expresión significativamente mayores que las EphB3^{-/-}. Por el contrario, las TEC EphB2LacZ expresan valores similares a las células WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de 3 aislamientos celulares. La comparación de los valores mutantes respecto a los WT se realizó según el análisis estadístico *one t-test* y entre mutantes según la *t* de Student y la significación se indica como: * $p \leq 0.05$.

A partir de estos supuestos y asumiendo la posibilidad de que la falta de interacciones entre Eph y ephrinas-B en los timos mutantes generaría alteraciones en la morfología de las TECs que podrían afectar los contactos célula-célula y con ello las interacciones entre otras moléculas, analizamos el papel del par RANK y RANKL en la maduración del epitelio medular, estudiando, en primer lugar, la capacidad de maduración de las mTEC en presencia/ausencia de timocitos. Para ello, cultivamos *in vitro* durante 6 días lóbulos tímicos de 14.5F, tanto WT como mutantes, en ausencia o presencia de 2'-dGuo y transcurrido este tiempo analizamos la proporción de TECs medulares maduras definidas como células CD40^{hi}CD80⁺ o células MHCII^{hi}UEA1^{hi} en cada uno de los cultivos.

Tal y como se muestra en los *dot plots* de la **Figura 200**, la presencia de timocitos (cultivos sin 2'-dGuo) en los cultivos WT correlacionaba con la aparición de la población medular CD40^{hi}CD80⁺ (**Fig. 200A**) pero no en aquellos mantenidos sin timocitos (cultivos con 2'-dGuo) (**Fig. 200B**). Los resultados fueron similares cuando se utilizaron lóbulos tímicos mutantes en cuanto a la falta de maduración epitelial. Sin embargo, en aquellos que contenían timocitos, todos los lóbulos mutantes mostraron una reducción significativa en la proporción de células CD40^{hi}CD80⁺ respecto a los valores de los lóbulos WT (**Fig. 200C**), reproduciendo la condición ya observada *in vivo* en los timos deficientes en EphB durante el desarrollo fetal y postnatal (**Fig. 103A**). Por el contrario, no había diferencias entre WT y mutantes en aquellos cultivos establecidos en ausencia de timocitos (**Fig. 200D**).

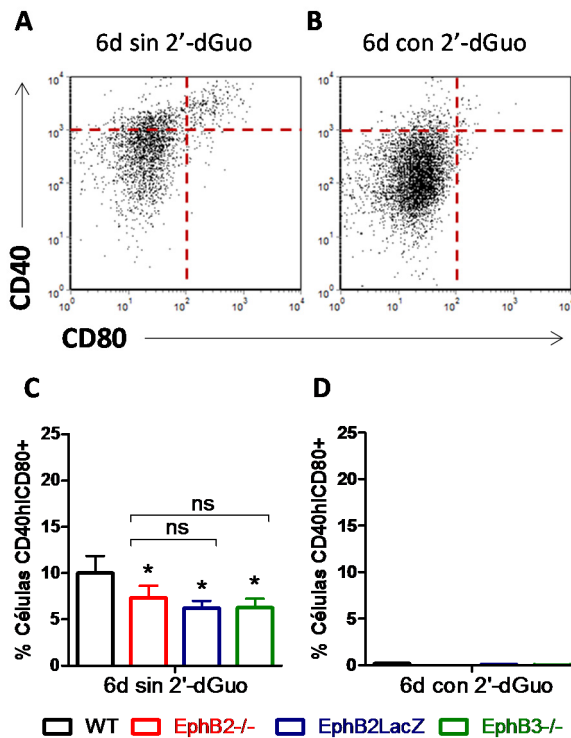


Figura 200. Análisis de la subpoblación de TECs medulares CD40^{hi}CD80⁺ en FTOCs WT y mutantes cultivados en ausencia o presencia de 2'-dGuo durante 6 días. Dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻ en FTOCs WT de 14.5F cultivados 6 días en ausencia de 2'-dGuo (**A**) y 6 días en presencia de la misma (**B**) se identificó la subpoblación epitelial CD40^{hi}CD80⁺. Los *dot plots* son representativos de los cultivos analizados. (**C**) Los FTOCs mutantes muestran un porcentaje significativamente menor de TECs medulares maduras CD40^{hi}CD80⁺ que los FTOCs WT a los 6 días de cultivos sin 2'-dGuo, mientras que en presencia de la misma, la subpoblación epitelial estudiada desaparecía en todos ellos. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 3 experimentos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Resultados similares se obtuvieron analizando la población epitelial medular MHCII^{hi}UEA1^{hi} WT. En presencia de timocitos, se identificó la población (**Fig. 201A**) pero no en aquellos cultivos que no contenían timocitos (**Fig. 201B**). Una vez más, los lóbulos mutantes mostraban porcentajes significativamente más bajos de células MHCII^{hi}UEA1^{hi} en los cultivos que contenían timocitos (**Fig. 201C**), reproduciendo el

efecto observado en los timos mutantes de 17.5F (**Fig. 98B**). Por otro lado, no hubo diferencias al comparar entre WT y mutantes en ausencia de timocitos (**Fig. 201D**).

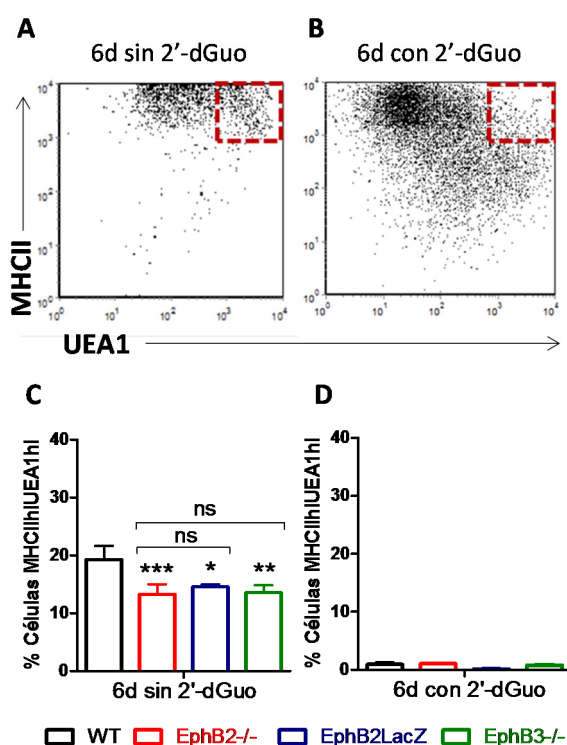


Figura 201. Análisis de la subpoblación de células MHCII^{hi}UEA1^{hi} en FTOCs WT y mutantes cultivados en ausencia o presencia de 2'-dGuo durante 6 días. Dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻ en FTOCs WT de 14.5F cultivados 6 días en ausencia de 2'-dGuo (**A**) y 6 días en presencia de la misma (**B**) se identificó la subpoblación epitelial MHCII^{hi}UEA1^{hi}. Los *dot plots* son representativos de los cultivos analizados. (**C**) Los FTOCs mutantes muestran un porcentaje significativamente menor de células MHCII^{hi}UEA1^{hi} que los FTOCs WT a los 6 días de cultivos sin 2'-dGuo, mientras que en presencia de la misma (**D**), la subpoblación epitelial estudiada disminuía, hasta casi desaparecer, tanto en lóbulos mutantes como en WT. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 3 experimentos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Los resultados anteriormente descritos demuestran como la presencia de timocitos es necesaria para la maduración de las TECs medulares maduras y como las EphB están interviniendo además, en este proceso. En este caso, la falta de interacciones célula-célula dificultaría la interacción entre otros pares, incluidos RANK-RANKL. Para analizar si las diferencias observadas en las TECs mutantes podían deberse a problemas en la señalización de RANK en las TECs, por una incorrecta interacción con los timocitos, lóbulos tímicos WT y mutantes de 14.5F alinfoides, tras tratamiento con 2'-dGuo durante 6 días, fueron estimulados 4 días más con un anticuerpo agonista anti-RANK que activa el receptor, supliendo así la falta de señalización mediada a través de RANKL expresado en los timocitos. Transcurrido este tiempo analizamos la aparición de las poblaciones epiteliales previamente definidas usando como control del procedimiento experimental un anticuerpo no relacionado (anti-IgG, control de isotipo).

Tal y como se muestra en los *dot plot* de la **Figura 202**, en los cultivos WT establecidos con el control de isotipo no hubo incremento de la proporción de células CD40^{hi}CD80⁺ (**Fig. 202A**), pero sí en aquellos que lo hacían en presencia del agonista anti-RANK (**Fig.**

202B), demostrando que la estimulación con el anticuerpo inducía la diferenciación de las TECs medulares. En cultivos de lóbulos alinfoideos mutantes los resultados fueron similares (**Fig. 202C, D**), y aún más, no había diferencias en la proporción de células $CD40^{hi}CD80^{+}$ con respecto a los WT (**Fig. 202D**), ya que los mutantes recuperaban aparentemente el fenotipo WT.

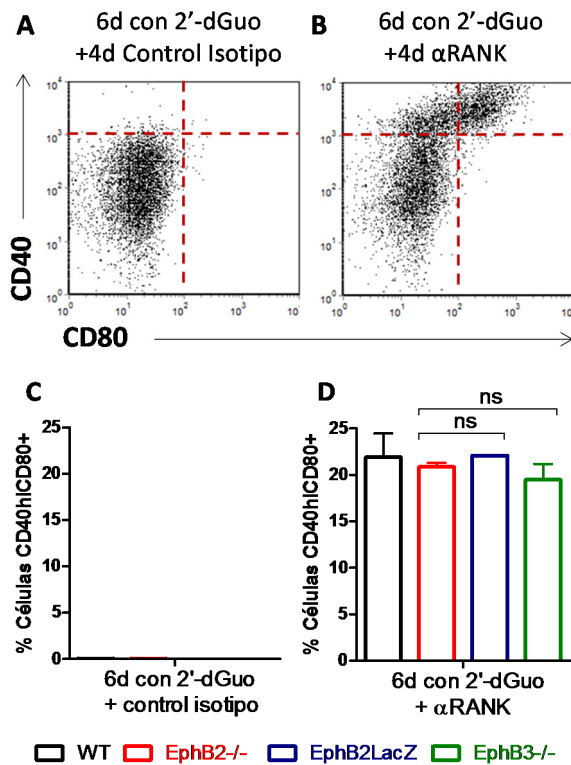


Figura 202. Análisis de la subpoblación de células $CD40^{hi}CD80^{+}$ en FTOCs alinfoideos WT y mutantes estimulados con el anticuerpo anti-RANK. Proporción de células $CD40^{hi}CD80^{+}$ dentro de la población epitelial total $EpCAM^{+}CD45^{-}$ en FTOCs WT alinfoideos tratados durante 4 días con el control de isotipo (**A**) o con un anticuerpo anti-RANK (**B**). Los *dot plots* son representativos de los cultivos analizados. (**C**) Los FTOCs alinfoideos WT y mutantes tratados con el control de isotipo no recuperan la subpoblación $CD40^{hi}CD80^{+}$, mientras que aquellos estimulados con anti-RANK (**D**) sí lo hacen, pero sin observar diferencias entre WT y mutantes. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 3 experimentos.

Cuando analizamos la aparición de la población $MHCII^{hi}UEA1^{hi}$ en los timos WT (**Fig. 203**), de nuevo, la estimulación con anti-RANK inducía un incremento de la misma (**Fig. 203B**), con respecto a aquellos cultivados con el control de isotipo (**Fig. 203A**). Una vez más, en el caso de los lóbulos mutantes tratados con el control de isotipo no había diferencias (**Fig. 203C**) y tampoco en aquellos estimulados con el agonista, recuperando en este último caso, de nuevo, los valores WT (**Fig. 203D**). Al comparar entre mutantes no se observaron diferencias entre los FTOC EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, pero sí en aquellos entre EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} donde estos últimos mostraban una proporción significativamente menor.

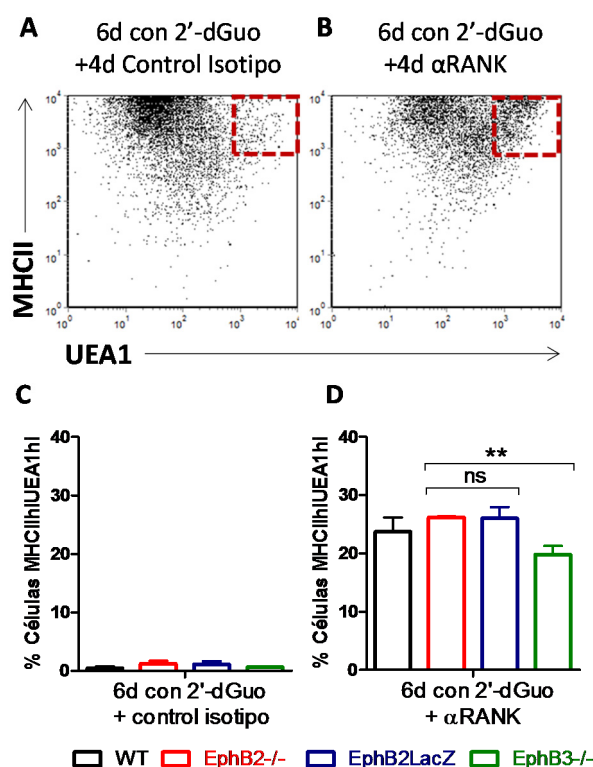


Figura 203. Análisis de la subpoblación de células MHCII^{hi}UEA1^{hi} en FTOCs WT y mutantes alinfoides estimulados con anti-RANK. Proporción de células MHCII^{hi}UEA1^{hi} dentro de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻ en FTOCs WT alinfoides tratados durante 4 días con el control de isotipo **(A)** o con el anticuerpo anti-RANK **(B)**. Los *dot plots* son representativos de los cultivos analizados. **(C)** Los FTOCs alinfoides WT y mutantes tratados con el control de isotipo no recuperan la subpoblación MHCII^{hi}UEA1^{hi}, mientras que aquellos estimulados con anti-RANK **(D)** sí lo hacen, sin observarse diferencias entre WT y mutantes y entre estos últimos en el caso de los FTOCs EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}. Los datos corresponden a la media (\pm SD) de, al menos, 3 experimentos. La significación estadística de los valores obtenidos se indica como: ** $p \leq 0.01$ según el análisis estadístico de la *t* de Student.

Estos resultados sugieren, por tanto, que en los timos mutantes la falta de interacciones entre Eph y ephrinas-B afectan las interacciones timocitos-TECs, e indirectamente las interacciones RANK-RANKL necesarias para la diferenciación epitelial medular.



DISCUSIÓN

Numerosos estudios, realizados por nosotros y otros autores (*García-Ceca y cols., 2015*), sobre Eph/ephrinas y timo han puesto reiteradamente de manifiesto que estas moléculas juegan un importante papel en la biología del órgano, alterándose en su ausencia numerosos procesos que acontecen en él. En los últimos años, nuestro trabajo en este ámbito se ha enfocado principalmente sobre dos de estos receptores, EphB2 y EphB3, que en otros sistemas son importantes para el control del desarrollo epitelial (*Roberts y Horsley, 2014*). Así, hace unos años demostramos que el desarrollo del epitelio tímico estaba profundamente alterado en ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3 (*García-Ceca y cols., 2009a*), aunque las poblaciones de timocitos definidas por la expresión de los marcadores CD4/CD8 lo estaban en mucha menor medida (*Alfaro y cols., 2008*).

En el presente trabajo hemos profundizado en la caracterización de los cambios sufridos durante el desarrollo por el epitelio tímico de ratones deficientes en estas EphB. Nuestros resultados confirman, utilizando distintas aproximaciones experimentales, la existencia de los cambios previamente descritos (*García-Ceca y cols., 2009a*), los cuantifica y añade información sobre su posible origen, poniendo de manifiesto una vez más la relevancia que esta familia de receptores y sus ligandos, las ephrinas-B, tienen para la organización y homeostasis del timo.

En general, nuestro estudio confirma una mayor severidad del fenotipo tímico en ausencia de EphB2 que de EphB3; cierta recuperación del fenotipo EphB2^{-/-} en presencia de señal *reverse* en los ratones EphB2LacZ, aunque no en todos los parámetros estudiados y la especificidad de los genotipos EphB2 y EphB3, que confirma la idea ya expuesta por nosotros en varias ocasiones (*Alfaro y cols., 2011; García-Ceca y cols., 2015*) de que distintas combinaciones de señales entre los pares celulares que las establecen determinan fenotipos distintos y específicos.

Todos los timos deficientes en EphB cursan con bajo contenido celular que afecta tanto a timocitos como a TEC, y con retraso de la maduración de las poblaciones epiteliales y linfoides, y aunque los patrones de desarrollo son similares a los de los timos WT, se alcanzan a distintos tiempos lo que gradualmente va agrandando las diferencias con los timos WT.

La implicación de Foxn1 en los fenotipos mutantes observados podría ser distinta durante el periodo fetal y en el timo adulto

Un primer elemento considerado clave para el desarrollo y diferenciación del epitelio tímico es Foxn1, un factor de transcripción considerado “máster” en esos procesos, aunque no está implicado en la determinación del esbozo tímico en la mencionada tercera bolsa faríngea (*Vaidya y cols., 2016*). A 11.5F Foxn1 induce la diferenciación del epitelio tímico en la parte distal del primordio común derivado de la tercera bolsa faríngea, de manera que en su ausencia se genera un timo quístico que bloquea la llegada de progenitores linfoides y su diferenciación (*Nehls y cols., 1996*).

Hay realmente muy pocos datos que relacionen las primeras etapas del desarrollo tímico y las Eph, así como Foxn1 y estas moléculas. El desarrollo inicial del primordio tímico de 11.5F es normal o, más precisamente, con los marcadores utilizados no somos capaces de observar diferencias entre timos WT y mutantes, algo que ya habíamos apuntado con antelación (*García-Ceca y cols., 2009a*). También, habíamos indicado que la falta de EphB2 no afecta el patrón general de *branching* que inicia el primordio tímico, pero altera el desarrollo de sus ramas epiteliales que aparecen colapsadas (*Munoz y cols., 2009*). Más recientemente, implicamos a la ephrina-B2 en el crecimiento longitudinal de tales ramas (*Cejalvo, 2011*) y Foster y colaboradores (*Foster y cols., 2010*) demostraron que la expresión de esta ephrina en el mesénquima de la cresta neural es necesaria para la migración del primordio tímico de la parte anterior a la cavidad torácica. No obstante, en los mutantes aquí estudiados deficientes en EphB2 o EphB3 la expresión de las ephrinas-B1 y -B2 no sufrían variaciones, como ya habíamos demostrado (*Alfaro y cols., 2008*).

Por otro lado, algunos datos indirectos sugieren que Foxn1 podría actuar *upstream* de EphB2 y EphB3 de manera que la falta de los receptores no afectaría directamente la expresión de Foxn1. Otra posibilidad es que morfógenos conocidos por regular la expresión de Foxn1 en el timo (*Vaidya y cols., 2016*) y de otros factores de transcripción de la familia Fox en otros tejidos podrían afectar también directa o indirectamente a EphB2 y EphB3. En cualquier caso, ambas vías, Foxn1 y EphB, parecen ser *targets* de morfógenos (BMP2/4, Wnt) implicados en el establecimiento del esbozo tímico a partir del endodermo faríngeo (*Blackburn y cols., 1996; Balciunaite y cols.,*

2002; Tsai y cols., 2003; Osada y cols., 2010; Heinonen y cols., 2011a; 2011b). En el intestino, FoxL1, otro miembro de la familia Fox, regula la relación entre el complejo β -catenina/TCF-4 de la ruta canónica de señalización de Wnt, y la expresión de EphB2 y EphB3 (Takano-Maruyama y cols., 2006). Por otro lado, la expresión constitutiva de β -catenina en TECs cambia el comportamiento del epitelio tímico asemejándolo parcialmente al de los timos deficientes en EphB con caída del número de TECs en ciclo, bajos niveles de CCL25 o de la expresión de IL7 (Zuklys y cols., 2009). Más importante es que la falta de Kremen 1, que regula la misma vía canónica de Wnt, resulta en profundas alteraciones del epitelio tímico muy parecidas a las descritas en los timos deficientes en EphB (Osada y cols., 2006). Similares alteraciones ocurren en ratones que expresan niveles bajos de Foxn1 (Nowell y cols., 2011), sugiriendo que, como decíamos, hay cierta correlación entre los papeles jugados en el desarrollo epitelial tímico entre Wnt, Foxn1 y EphB.

Si vamos a los resultados obtenidos observamos distinto comportamiento de la expresión de Foxn1 en timos fetales y adultos, algo ya indicado por otros autores (O'Neill y cols., 2016). Aunque somos incapaces de explicar su significado con los datos que tenemos, queremos llamar la atención sobre un par de cosas. Aparentemente, la ausencia de EphB2 o EphB3 no cursa en el timo embrionario con cambios en la expresión de Foxn1, lo que sugiere que esta molécula no sería responsable de los cambios observados en la diferenciación epitelial y linfóide tanto en los timos mutantes de 12.5F como de 15.5F. Quizás, como antes señalábamos, alguna otra de las moléculas que afectan las EphB podría ser responsable de tales cambios. Por el contrario, las TECs aisladas de timos postnatales mutantes mostraban menor expresión de Foxn1 con diferencias estadísticamente significativas en el caso de EphB2^{-/-} y EphB2LacZ. Es importante resaltar que de acuerdo a otros resultados de nuestro trabajo, que serán discutidos después, la falta de EphB2 afecta más al desarrollo del epitelio medular que la de EphB3. En este caso, a este fenotipo más severo podría contribuir la menor expresión de Foxn1, dado que sus efectos son muy dependientes de dosis (Nowell y cols., 2011) y en el timo adulto una caída al 30% de los valores WT induce involución tímica (Vaidya y cols., 2016), un fenotipo también muy parecido al de los ratones adultos EphB2^{-/-}. Curiosamente, las poblaciones epiteliales postnatales más afectadas por el descenso de la expresión de Foxn1 corresponden a

las más maduras MHCII^{hi}UEA1^{hi} (*Chen y cols., 2009*) que, como luego discutiremos, están particularmente afectadas en los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, pero no en los EphB3^{-/-}.

La hipocelularidad de los timos deficientes en EphB afecta los timocitos pero también a las células epiteliales (TECs)

La evidencia de un bajo contenido celular en timos deficientes en EphB ya había sido descrita por nosotros con anterioridad en ratones de 15.5F deficientes en EphB2 o EphB3, pero no había sido estudiado en ratones EphB2LacZ y se centraba principalmente en las subpoblaciones de timocitos (*Alfaro y cols., 2008*). Los actuales resultados indican que el patrón de evolución de la celularidad tímica total es similar en timos WT y mutantes, con un aumento particularmente importante a partir de 14.5F; no obstante, los valores son significativamente más bajos en los timos mutantes desde 13.5F en adelante, pero no a 12.5F, haciéndose mayores a medida que se acercan al nacimiento. No hay, sin embargo, diferencias significativas entre los tres mutantes estudiados, aunque cuando se analizan los valores en los distintos compartimentos tímicos: células linfoides CD45⁺ (EpCAM⁻CD45⁺), células epiteliales (EpCAM⁺CD45⁻) y células mesenquimales (EpCAM⁻CD45⁻), aparecían algunas. Esta falta de diferencias en la celularidad de los timos de 12.5F WT y mutantes obedece presumiblemente a que el mayor número de células CD45⁺ de los timos WT se equilibra con el ligeramente más elevado de TEC en los mutantes.

Como la celularidad total, el porcentaje y número absoluto de células CD45⁺, o el de células EpCAM⁻CD45⁺, que es el mismo, aumentaban desde un principio en detrimento de la población CD45⁻ que caía en proporción y aumentaba, aunque mucho menos que la población linfóide, en términos absolutos. Como antes describíamos para la celularidad total, el patrón de evolución de las poblaciones linfóide CD45⁺ y epitelial EpCAM⁺CD45⁻ era similar entre WT y timos mutantes, pero siempre con valores significativamente menores en el caso de estos últimos, particularmente, a partir de 14.5F en el caso del compartimento epitelial, algo vinculado a la mayor contribución del componente linfóide a la celularidad tímica total. El porcentaje de células CD45⁺ era significativamente menor ya a 12.5F en los timos mutantes debido a los déficits en la colonización de los progenitores linfoides mutantes, mientras en términos absolutos

las diferencias se hacían muy evidentes de 14.5F en adelante, cuando las interacciones timocitos-TEC están bien establecidas y las alteraciones generadas por la falta de EphB afectan a vías de señalización claves para la proliferación y diferenciación de las células linfoides como IL7/IL7R, Dll4/Notch1 y TcR β (ver luego). En todos estos casos, la comparación de los valores mutantes no mostraba diferencias muy obvias entre ellos, si bien la hipocelularidad tendía a ser mayor en los timos EphB2 $^{-/-}$.

La población CD45 $^{-}$ incluye, como indicábamos, tanto TECs, que expresan el marcador epitelial EpCAM (*Rossi y cols., 2007a*), como células mesenquimales, EpCAM $^{-}$. Las TECs EpCAM $^{+}$ CD45 $^{-}$, como habíamos observado en la población CD45 $^{-}$ total, disminuyen porcentualmente durante el desarrollo tanto de los timos WT como de los mutantes pero, en esta ocasión, con diferencias entre los propios mutantes: los EphB2 $^{-/-}$ mostraban porcentajes significativamente más altos que los controles en todos los estadios salvo a 17.5F; las diferencias de los timos EphB2LacZ y EphB3 $^{-/-}$ eran significativamente menores respecto de los valores WT. En términos absolutos, de nuevo, había diferencias entre el número de TECs de timos mutantes y WT; y entre los primeros cuando se comparaban entre sí. El número de TECs aumentaba en todos los casos pero con valores significativamente menores en los timos mutantes, que mostraban los números más bajos en el caso de EphB3 $^{-/-}$ y EphB2LacZ, porque el retraso en el desarrollo de las células EphB2 $^{-/-}$ acumulaba un mayor número de ellas. Estos resultados apoyaban, por tanto, que la ausencia de EphB2 provocaba una condición más severa en la hipocelularidad tímica. El análisis de la evolución del ratio EpCAM $^{-}$ CD45 $^{+}$ / EpCAM $^{+}$ CD45 $^{-}$ en timos WT y mutantes confirmó también estos resultados. En general, los ratios mutantes, particularmente en el caso de los timos EphB2 $^{-/-}$, son más bajos que los WT reflejando que, aunque los timos WT tienen en cada estadio estudiado más células linfoides, los mutantes tienen más TECs, salvo a 12.5F, en el que el número de TECs es similar en timos WT y todos los mutantes.

Como acontecía con la población epitelial, el porcentaje de células mesénquimales EpCAM $^{-}$ CD45 $^{-}$ disminuye a lo largo del desarrollo con una brusca caída entre 13.5F y 14.5F tanto en timos WT como mutantes. La evolución en términos absolutos era exactamente la contraria, con una etapa de crecimiento gradual hasta 15.5F y un aumento enorme a continuación. Esta reducción se había observado previamente en la población tímica mesenquimal que expresa PDGFR α (*Jenkinson y cols., 2007b*). Estas

variaciones parecen correlacionar bien con los estadios (alrededor de 13.5F) en los que se produce la invaginación del mesénquima dentro del parénquima tímico (*Suniara y cols., 2000*), su posterior diferenciación en células perivasculares y el establecimiento de la red vascular madura entre 15.5F y 17.5F (*Foster y cols., 2008*).

Los valores mutantes eran ligeramente menores respecto a los WT hasta 15.5F, en especial en los timos EphB2^{-/-} que presentaban las diferencias más significativas. Parece obvio que el menor tamaño de los timos mutantes conlleva un menor número de células mesenquimales, pero más importante es que las variaciones observadas en los timos mutantes respecto a la población CD45⁻ se deben básicamente a los descritos en las TECs EpCAM⁺CD45⁻.

Todos estos datos coinciden con resultados previos donde estudiamos la celularidad tímica a partir de 15.5F (*Alfaro y cols., 2008*), y otros en los que se pone de manifiesto como la ausencia de distintas Eph o ephrinas cursa con una fuerte caída de la celularidad que, en muchos casos, está asociada con un aumento de la apoptosis y/o con un descenso del porcentaje de células en ciclo, aunque esta condición es menos frecuente (*García-Ceca y cols., 2015*). Los posibles orígenes de esta hipocelularidad serán comentados más tarde en varios apartados de esta discusión.

Ratones EphA4^{-/-} muestran hipoplasia que aumentaba con la edad pudiendo llegar en el timo de 4 semanas a un descenso de la celularidad de 100 veces respecto a los timos WT de la misma edad (*Munoz y cols., 2006*). También en ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3 los timos muestran, como aquí confirmamos, baja celularidad (*Alfaro y cols., 2008*), lo mismo que en aquellos que sufrían deleciones selectivas de ephrina-B1 y/o -B2 en timocitos o TECs (*Cejalvo y cols., 2013*), ephrinas que son los ligados principales de las EphB que estudiamos en el presente trabajo. Por otra parte, la deleción específica de Rac-1, una GTPasa implicada en la señalización de las Eph, en células epiteliales K14⁺ o K5⁺ también cursa con fallo en la organogénesis tímica (*Hunziker y cols., 2011*). *In vitro*, FTOCs de ratas cultivados con proteínas de fusión solubles EphA1-Fc, EphA2-Fc, EphA3-Fc o con ephrina-A1Fc muestran celularidad reducida (*Munoz y cols., 2002*), igual que lóbulos tímicos de ratón cultivados con EphB2-Fc o ephrina-B1Fc (*Yu y cols., 2006; Alfaro y cols., 2007*).

Otros autores, sin embargo, han descrito números normales de células tímicas en ratones deficientes en EphB2 (*Coles y cols., 2004*) o en EphB6 (*Shimoyama y cols.,*

2002; Luo y cols., 2004). Curiosamente, EphB6 se expresa fuertemente en timo y aunque algunos autores indican que su falta no genera un fenotipo específico (Shimoyama y cols., 2002) sí parece afectar la funcionalidad de las células T periféricas (Luo y cols., 2004). Por otro lado, su sobre expresión parece cursar con hipocelularidad y la de EphB2 bajo control de los promotores de lck o de CD2 cursa con bloqueo de la maduración de timocitos DN2/DN3 y alteraciones histológicas en corteza y médula (Coles y cols., 2004). Otros autores apuntan que ephrina-B1, ligando de EphB2, es crítica para el desarrollo T (Yu y cols., 2004). Es importante señalar, en relación con esta disparidad de resultados, que los fenotipos generados por la ausencia de Eph/ephrinas son muy variables y en su severidad juega un importante papel el *background* genético de los ratones estudiados (Munoz y cols., 2006; Cejalvo y cols., 2013).

Alteraciones en la colonización linfoide del primordio tímico temprano afectan la celularidad linfoide de los timos deficientes en EphB

Para analizar en profundidad los orígenes de este bajo contenido celular consideraremos en principio, por separado, como contribuyen a él la capacidad de diferenciación, la supervivencia/muerte celular y la proliferación tanto de los timocitos como de las TECs. Hay que señalar a este respecto que la activación de Eph/ephrinas directamente o vía *crosstalk* con otros receptores superficiales (Murai y Pasquale, 2003) puede inducir cualquiera de esos procesos: división celular (Holmberg y cols., 2006; Ricard y cols., 2006), apoptosis (Dohn y cols., 2001; Depaepe y cols., 2005; Ricard y cols., 2006) o diferenciación celular (Aoki y cols., 2004). En el caso de la maduración linfoide intratímica hay otro elemento a considerar. Este órgano ni durante el periodo fetal ni en el estado adulto, posee progenitores con capacidad de auto-renovación por lo que la producción de timocitos necesita la colonización del timo por progenitores generados en otros órganos, concretamente en el hígado fetal y la médula ósea adulta (Douagi y cols., 2002; Zhang y Bhandoola, 2014). Consiguientemente, cualquier alteración que afecte esta colonización podría contribuir a la baja celularidad linfoide de los timos deficientes en EphB, independientemente de los posibles cambios en sus capacidades proliferativas y/o de supervivencia/muerte que también analizaremos.

A este respecto, nuestros resultados demuestran que el porcentaje de progenitores linfoides del timo fetal de 12.5F, identificados por la expresión del receptor de membrana PIR^{A/B} (Masuda y cols., 2005; Desanti y cols., 2011), era significativamente menor en los primordios tímicos mutantes que en los WT, sin diferencias entre los distintos mutantes, de manera que estos cambios y los que pudiera haber en su descendencia más temprana, podrían estar contribuyendo a la hipocelularidad linfoide observada en los timos mutantes. Previamente, habíamos demostrado que los timos adultos de ratones deficientes en EphB2 o EphB3 y, en menor medida, aquellos de ratones EphB2LacZ contenían porcentajes más bajos de progenitores tímicos tempranos (ETP: Lin⁻c-kit^{hi}CD44⁺CD25⁻) (Alfaro y cols., 2015).

Este menor porcentaje de progenitores linfoides intratímicos podría ser consecuencia de varios factores, no excluyentes entre sí: menor número de progenitores en el hígado fetal, de donde vienen; alteraciones en su capacidad de colonización del timo; muerte a su llegada al órgano y/o una menor capacidad de proliferación, un fenómeno que ocurre inmediatamente después de la llegada de los progenitores, y posiblemente mediado vía ligandos de CD44, c-kit y Notch, y de IL7 (Zlotoff y Bhandoola, 2011; Zhang y Bhandoola, 2014). Nuestros resultados actuales proporcionan algunas contestaciones a estas preguntas, confirmando resultados previos donde demostramos la necesidad de EphB2 y EphB3 para la correcta colonización del timo fetal y adulto (Stimamiglio y cols., 2010; Mendes-da-Cruz y cols., 2012; Alfaro y cols., 2015).

En relación con el número de progenitores presentes en el hígado fetal, nuestros datos demuestran que no hay diferencias ni en el porcentaje ni en el número absoluto de células PIR^{A/B+} presentes en el órgano de ratones WT y deficientes en EphB sugiriendo, por tanto, que el bajo número de progenitores linfoides observados en los timos de 12.5F de ratones mutantes no se debe a un menor número de progenitores en el hígado fetal desde donde colonizan el timo. Aunque no hay, hasta nuestro conocimiento, estudios similares a los aquí presentados sobre los progenitores linfoides del hígado fetal, nosotros y otros autores hemos demostrado que los progenitores hematopoyéticos de médula ósea expresan Eph/ephrinas y en su ausencia hay cambios en su número y/o en sus capacidades de movilización (Inada y cols., 1997; Ivanova y cols., 2002; Suenobu y cols., 2002; Wang y cols., 2002; Foo y

cols., 2006; Arthur y cols., 2011; Alfaro y cols., 2015). En relación con EphB2 y EphB3, las dos Eph estudiadas en este trabajo de Tesis Doctoral, recientemente demostramos que ratones deficientes en EphB2, pero no en EphB3, mostraban una reducción significativa del porcentaje de progenitores hematopoyéticos en médula ósea adulta: HSC (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺Flt3⁻IL7Rα⁻), MPP (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺Flt3⁺IL7Rα⁺), ELP (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺Flt3⁺IL7Rα⁺) y CLP (Lin⁻Sca-1^{lo}c-kit^{lo}Flt3⁺IL7Rα⁺). Por su parte, los ratones EphB2LacZ sólo mostraban valores inferiores a los WT en el caso de los progenitores más primitivos, HSC y MPP (Alfaro y cols., 2015). En ninguna circunstancia, sin embargo, progenitores considerados como la fracción colonizadora del timo, que expresan moléculas implicadas en el proceso, como CCR7, CCR9 o PSGL1 (Gossens y cols., 2009; Zlotoff y cols., 2010), mostraban diferencias entre los valores WT y mutantes (Alfaro y cols., 2015).

Parece, por tanto, que, de alguna manera, la colonización del primordio tímico por los progenitores presentes en el hígado fetal, más que el número de células capaces de llevar a cabo la colonización, está afectada en los ratones mutantes contribuyendo, sin duda, a su significativo descenso en los timos deficientes en EphB de 12.5F. Aunque en el presente trabajo no se han realizado experimentos para comprobar la naturaleza exacta de dichos defectos en la colonización, estudios previos, *in vivo* e *in vitro*, demostraron que tanto lóbulos fetales tímicos como ratones adultos que recibían progenitores linfoides Lin⁻ de médula ósea mostraban defectos en la colonización tímica en ausencia de EphB2 o EphB3 (Stimamiglio y cols., 2010; Alfaro y cols., 2015).

En el caso de los timos adultos, progenitores mutantes mostraban una capacidad menor para colonizar los timos WT especialmente cuando las células mutantes eran inyectadas en condiciones competitivas con progenitores WT. La severidad de la reducción era mayor utilizando progenitores EphB2^{-/-}, pero ocurría también con los otros mutantes, indicando que la señal *forward* transmitida por EphB2, y en menor medida por EphB3, juegan un importante papel en el proceso. En este caso, aunque la señal *reverse* inducida por EphB2 mejoraba la colonización de los ratones EphB2LacZ no rescataba el fenotipo WT (Alfaro y cols., 2015), a diferencia de lo que habíamos observado en ensayos *in vitro* de reconstitución de lóbulos tímicos fetales donde dicha señal transmitida por las ephrinas-B expresadas en el estroma de los lóbulos recuperaba los niveles de colonización WT (Stimamiglio y cols., 2010), sugiriendo que la

colonización fetal y adulta del timo no son del todo iguales como habían apuntado otros autores (*Jenkinson y cols., 2007a*). Estos estudios, tanto con lóbulos fetales como adultos, también demostraban defectos en la colonización de precursores WT de lóbulos tímicos mutantes enfatizando la importancia del microambiente tímico en el proceso, algo que también sugieren los resultados aquí presentados. No hay que olvidar que no encontramos diferencias en el número de progenitores capaces de migrar desde el hígado fetal al timo en los ratones mutantes y, por el contrario, la organización histológica de los timos mutantes está profundamente alterada (*García-Ceca y cols., 2009a*), sugiriendo que la caída de los progenitores en el timo podría obedecer a defectos en el propio órgano.

En este sentido, y como ya habíamos demostrado con anterioridad en lóbulos fetales tímicos de 15.5F (*Stimamiglio y cols., 2010*) y en los timos adultos (*Alfaro y cols., 2015*), los primordios tímicos mutantes de 12.5F y 13.5F mostraban una importante reducción en la producción de CCL21 y CCL25, conocidas por su implicación en la colonización tímica, mientras en el caso de CXCL12 no había diferencias significativas a 12.5F respecto de los valores controles, pero sí una reducción a 13.5F.

CCL21 y CCL25 son consideradas quimiocinas fundamentales para la migración de la primera oleada de progenitores al primordio tímico dado que: ratones CCR7^{-/-} y CCR9^{-/-} muestran un profundo bloqueo de la colonización antes del establecimiento de la vascularización (*Liu y cols., 2006*), anticuerpos neutralizantes de CCL21 y CCL25 inhiben la migración de progenitores aislados de hígado fetal a lóbulos tímicos fetales cultivados (*Jenkinson y cols., 2007a*), y nuestros resultados previos demuestran que la reducción de la migración de progenitores Lin⁻ de médula ósea de ratones EphB2^{-/-} era particularmente severa en respuesta a CCL25 (*Stimamiglio y cols., 2010*). Por el contrario, el papel de CXCL12 en estos procesos es más controvertido (*Ara y cols., 2003; Robertson y cols., 2006*) habiéndose apuntado la posibilidad de que sea redundante con el papel de CCL21 y CCL25 (*Calderon y Boehm, 2011*), lo que podría explicar que en el presente estudio, la expresión de CXCL12 en lóbulos tímicos de 12.5F sea igual en ratones mutantes y WT. Después su caída a 13.5F podría estar relacionada con la migración y maduración de las células DN1 retrasada en estos timos, una función en la que la quimiocina ha sido implicada previamente (*Benz y cols., 2004*).

Por otro lado, la participación de Eph/ephrinas en fenómenos de migración con el concurso de quimiocinas y sus receptores y de moléculas de adhesión es sobradamente conocido (*Sharfe y cols., 2002; Aasheim y cols., 2005; Kitamura y cols., 2008; Pfaff y cols., 2008; Trinidad y cols., 2010*). En este sentido, recientemente demostramos que la menor migración de progenitores Lin⁻ a timos EphB2^{-/-} correlacionaba con una reducción en la expresión de ephrinas-B1 y -B2 en los endotelios vasculares por donde los progenitores acceden al timo adulto, mientras que en los timos EphB3^{-/-} la caída sólo afectaba a la ephrina-B1 (*Alfaro y cols., 2015*). Previamente, habíamos observado que la migración *in vitro* de progenitores linfoides mutantes a través de gradientes de quimiocinas o de sustratos recubiertos de fibronectina o laminina estaba significativamente reducida (*Stimamiglio y cols., 2010*). Estos resultados sugieren, consiguientemente, que un cierto defecto en la colonización de los progenitores linfoides que llegan al primordio tímico mutante desde el hígado fetal debe estar aconteciendo y, por tanto, contribuyendo a la hipocelularidad linfoide del timo, como consecuencia de las alteraciones en la organización del microambiente tímico que cursaban con defectos en la producción de quimiocinas, principalmente CCL21 y CCL25.

El descenso de la proliferación y el aumento de la apoptosis en los timocitos desde sus estadios más tempranos también contribuyen a la hipocelularidad tímica de los ratones deficientes en EphB

¿Era solamente este defecto en la colonización de los progenitores lo que contribuía al bajo porcentaje de progenitores linfoides presente en los timos mutantes? Nuestros resultados sobre el ciclo celular de la población tímica CD45⁺ indicaban claramente que no. Aunque el porcentaje de células CD45⁺ WT en ciclo disminuía ligeramente de 12.5F a 14.5F, lo que nos explica el aumento de la celularidad linfoide de 14.5F a 15.5F y de 15.5F a 17.5F, es el aumento experimentado por el número de células que dividen. En estos timos WT, el número de células linfoides en ciclo aumenta aproximadamente 10 veces entre 13.5F y 14.5F y otras 8 entre este último estadio y el siguiente, para multiplicarse por 9 veces entre 15.5F y 17.5F.

En todos los estadios estudiados entre 12.5F y 17.5F, el porcentaje de células linfoides CD45⁺ en ciclo es significativamente menor en los timos de los tres ratones mutantes que en los WT, lo que en términos absolutos hace que las diferencias en el número de células en ciclo a 17.5F entre los timos mutantes y WT sean simplemente abismales, explicando la importante hipocelularidad linfoide de los timos mutantes. Así, mientras el número de células CD45⁺ en ciclo en los timos mutantes a 12.5F es sólo ligeramente menor al de los WT, debido a la alta variabilidad en el número de células obtenidas de los timos mutantes, a partir de 13.5F es significativamente menor y los valores van disminuyendo hasta el punto de que a 17.5F el número de células linfoides en ciclo en los timos WT es aproximadamente el doble que el de los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-}, y más de tres veces el de los EphB2^{-/-} (**ver Tabla 3**). Ya habíamos demostrado en ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3, no se estudió la condición de EphB2LacZ, que mostraban a 15.5F, 17.5F y 2PN un menor porcentaje de timocitos en ciclo que pertenecían a los compartimentos DN y DP. Por tanto, nuestros datos actuales confirman y amplían a estadios más tempranos la menor proliferación de los timocitos deficientes en EphB. Por otro lado, aunque no analizamos exactamente las subpoblaciones implicadas en la proliferación en estos estadios deben corresponder, sin duda, a timocitos DN (**ver Tabla 1**).

Otros autores han descrito en distintos órganos: intestino (*Holmberg y cols., 2006*), pulpa dentaria (*Arthur y cols., 2009*) y progenitores neurales hipocampales (*Chumley y cols., 2007*) que la activación de la vía de señalización de las EphB introduce las células en ciclo. En el caso de las células linfoides, aparte de los datos ya comentados respecto a los timos deficientes en EphB2 y/o EphB3 adultos, y en aquellos de ratones deficientes en EphA4, la disminución de células linfoides correlacionaba con una menor proporción de células en proliferación pertenecientes a todos las subpoblaciones de timocitos (*Munoz y cols., 2006*). *In vitro*, FTOCs en los que se bloquean las interacciones entre EphA y ephrinas-A mediante proteínas solubles no presentaban cambios en las proporciones de células en proliferación, y en ratones con ephrina-B1 y/o -B2 eliminados específicamente en timocitos aumentaba el porcentaje de timocitos en ciclo (*Cejalvo y cols., 2013*), algo que se ha interpretado como un mecanismo para recuperar la baja celularidad mostrada por todos estos ratones mutantes (*Yu y cols., 2006*).

En el caso de la supervivencia linfoide en los timos mutantes, resultados previos que estudiaban estos parámetros en ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3 mostraban un mayor porcentaje de timocitos apoptóticos entre 15.5F y 2PN, fundamentalmente en los compartimentos DN y DP (Alfaro y cols., 2008). En el presente trabajo, extendemos este estudio a estadios anteriores y a ratones EphB2LacZ observando que la menor supervivencia linfoide en los timos mutantes se iniciaba ya a 13.5F en los tres ratones mutantes pero no a 12.5F donde realmente el número de células linfoides es aún muy bajo. En este estadio, por un lado, prácticamente todas las células CD45⁺ expresan PIR^{A/B} y, por otro, un 90% son DN1 y el resto DN2. Puesto que la expresión de PIR^{A/B} se down-regula a medida que aparece CD25, o sea entre el estadio DN1 y DN2, en gran medida células PIR^{A/B+} y DN1 son lo mismo a 12.5F, aunque funcionalmente se consideran progenitores distintos (Masuda y cols., 2005). En general, los resultados publicados respecto a distintas Eph/ephrinas indican que la falta de señalización a través de tales moléculas cursa con un descenso de la supervivencia celular (Munoz y cols., 2006; Cejalvo y cols., 2013; Garcia-Ceca y cols., 2015). También algunos resultados *in vitro*, en los que se bloqueaba o activaba la señalización mediada por Eph/ephrinas, demuestran la relación de estas moléculas con la muerte celular (Luo y cols., 2001; Munoz y cols., 2002; Freywald y cols., 2003; 2006), aunque en estos casos los efectos parecen dependientes de la densidad de proteínas de fusión utilizadas (Alfaro y cols., 2007).

Debemos concluir, por tanto, que el menor número de progenitores linfoides observados en los timos mutantes puede ser consecuencia, en un principio, de defectos en la colonización del primordio pero después también de una baja tasa de proliferación de los progenitores linfoides a partir de 12.5F y, en menor medida, de su mayor índice apoptótico. Así, el número absoluto de células linfoides que morían en estos primeros estadios del desarrollo en los timos mutantes era significativamente más bajo que en los WT, contribuyendo en menor medida a la hipocelularidad del órgano, aunque porcentualmente, los timocitos mutantes claramente mueran más.

Por otro lado, nuestros resultados confirman los previamente descritos en el timo fetal de 15.5F de estos mismos ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3 en el sentido de mostrar un aumento de la proporción de células DN1 y un descenso en la del compartimento DN3 (Alfaro y cols., 2008). A 12.5F y 13.5F las únicas poblaciones

identificadas tanto en los timos WT como en los mutantes eran las DN1 y las DN2, que mostraban en los tres timos mutantes un significativo retraso en la maduración linfóide lo que resultaba en la acumulación de los porcentajes de células DN1 y la disminución de la de DN2. A 14.5F ya aparecían las poblaciones DN3 y DN4 y, era posible apreciar que el retraso en la maduración era más severo en los timos EphB2^{-/-} que en los EphB3^{-/-} y EphB2LacZ, de manera que en el caso de los primeros los valores de las dos subpoblaciones continuaban siendo significativamente más bajos que los WT, pero las proporciones de células DN4 eran más altas en EphB2LacZ y EphB3^{-/-} que en timos WT y, por supuesto, que en EphB2^{-/-}, por su retraso en pasar al compartimento DP donde sus valores a 15.5F eran significativamente inferiores que en los timos WT (Alfaro y cols., 2008).

Recientemente, nosotros y otros autores encontramos fenotipos semejantes en ratones deplecionados de ephrina-B1 y/o -B2 selectivamente en timocitos. Ratones que no expresan en ellos una o las dos ephrinas-B sufrían un bloqueo parcial de la maduración T en DN3 (Jin y cols., 2011; Cejalvo y cols., 2013). También estos ratones mostraban distintas alteraciones más o menos severas y dependientes del *background genético* del ratón (Cejalvo y cols., 2013). Otros autores, por el contrario, no describen cambios en el timo de ratones con delección de ephrina-B2 condicionada a la expresión de IL7 en TECs (Foster y cols., 2010).

No obstante, los escasos datos publicados indican que los defectos en distintas Eph o ephrinas cursan con efectos distintos sobre la diferenciación T. Mientras ratones deficientes en EphA4 muestran un severo bloqueo de la maduración T con una enorme caída de los porcentajes de células DP (Munoz y cols., 2006); otros autores, como ya se ha indicado, no encontraban alteraciones en ratones deficientes en EphB6 (Shimoyama y cols., 2002). Los datos también permiten aventurar que más importante que la mera presencia/ausencia de ciertas Eph o ephrinas, lo es el balance de señales *forward* y *reverse* transmitidas por timocitos y estroma tímico, como ya hemos discutido, y se desprende de algunos de los presentes resultados, que más tarde comentaremos. Esta idea se evidenció claramente cuando se estudia el fenotipo linfóide en timos quiméricos creados con progenitores Lin⁻ de médula ósea provenientes de ratones con distintas deficiencias en EphB (Alfaro y cols., 2011). Mientras quimeras generadas con progenitores EphB2^{-/-} o dobles KO EphB2/EphB3

eran incapaces de recuperar las poblaciones más allá del estadio DN, aquellas que recibían células EphB2LacZ contenían timocitos DP pero no SP, y las establecidas con EphB3-/- mostraban porcentajes bajos de timocitos DP. No obstante, es llamativo que los timos de ratones con deficiencias en Eph o ephrinas-B bloqueen parcialmente su diferenciación T en el estadio DN3. Esto nos permite especular con que estas moléculas podrían estar relacionadas con algunos de los fenómenos que acontecen en este estadio y que “empujan” las células DN al siguiente compartimento DP, como son la selección TcR β o la respuesta a señales mediadas por Notch y sus ligandos o a IL7 (Hozumi y cols., 2008; Koch y cols., 2008; Shah y Zuniga-Pflucker, 2014).

Más concretamente, durante los primeros estadios del desarrollo, IL7 y su receptor parecen claves, junto con Dll4, para la proliferación de las primeras poblaciones linfoides, DN1 y DN2 (Hozumi y cols., 2008; Koch y cols., 2008; Thompson y Zuniga-Pflucker, 2011; Hirano y cols., 2015). IL7 aparece a 12.5F (Alves y cols., 2010), como demuestran también nuestros estudios por qPCR, y entre 13 y 14 días se expresa en la mayoría de las TECs del primodio tímico (Ribeiro y cols., 2013), para descender en los días siguientes (Zamisch y cols., 2005). Aunque nuestros datos sobre la expresión de IL7 en epitelio tímico eran más bajos en el epitelio mutante que en el WT, las diferencias no eran significativas. Sin embargo, en un estudio preliminar, no incluido en este trabajo, donde analizamos la expresión de la cadena α del receptor de IL7 por qPCR en lóbulos tímicos completos de 13.5F a 15.5F, que contenían tanto epitelio como timocitos, observábamos en todos los estadios y tanto en lóbulos EphB2-/- como en EphB3-/- (no se estudiaron EphB2LacZ) un significativo descenso del número de transcritos IL7R α (datos no mostrados). Estos resultados coinciden con los de Luo y colaboradores (Luo y cols., 2011b) quienes describieron una menor expresión de esta molécula en timocitos con delección específica de ephrina-B1 y -B2, y permiten suponer que en nuestros ratones deficientes en EphB, una menor señalización de la vía IL7/IL7R α contribuiría al menor porcentaje de timocitos en ciclo encontrados en los timos embrionarios mutantes.

La implicación de la vía de Notch en la proliferación y maduración linfoide T temprana es un hecho perfectamente conocido (Wolfer y cols., 2002; Tanigaki y cols., 2004). La señalización a través de Notch es necesaria constantemente para la maduración de las células DN, aunque distintos *subsets* tienen requerimientos diferentes; por ejemplo,

los más primitivos no se desarrollan sin una señalización constante, pero DN3, sí. Además, Notch induce la reordenación de los genes de la cadena β del TcR y de la cadena subrogada pT α (Tanigaki y cols., 2004). En el timo se expresan todos los ligandos de Notch, salvo Dll3, pero aparentemente sólo Dll4 está implicado en la activación del receptor en el órgano (Schmitt y Zuniga-Pflucker, 2002; Harman y cols., 2003; 2004), pues sólo la falta de Dll4 condicionada a células TECs bloquea *in vivo* el desarrollo T (Koch y cols., 2008); la de Jagged1, Jagged2 (Jiang y cols., 1998; Mancini y cols., 2005) o Dll1, no (Hozumi y cols., 2004), aunque la expresión de este último en células estromales permite el desarrollo T completo *in vitro* (Jaleco y cols., 2001; Schmitt y Zuniga-Pflucker, 2002). Por otro lado, datos recientes asumen que timocitos maduros necesitan Dll4 para el desarrollo del linaje T $\alpha\beta$ y que mientras la señalización a través del pre-TcR dispara la diferenciación de los timocitos DN3 al compartimento DP, Dll4 es responsable de la expansión del compartimento transitorio DN3-DN4-DP (Hirano y cols., 2015). Por todas estas razones, analizamos por qPCR la expresión de Dll4 en lóbulos de 12.5F cuando ya había transcritos, como había sido previamente descrito (Itoi y cols., 2007), y en TECs en estadios más avanzados, encontrando descensos significativos de la expresión de la molécula en células EphB2 $^{-/-}$ y EphB3 $^{-/-}$, especialmente a 15.5F, lo que ha de contribuir a la caída observada de la proliferación de las células linfoides. Además, en lóbulos totales el número de transcritos TcR β es significativamente más bajo, desde 13.5F a 15.5F, en aquellos derivados de ratones EphB2 $^{-/-}$ y en los EphB3 $^{-/-}$, que en los WT, contribuyendo con ello al retraso en la maduración de las poblaciones linfoides DN3 y siguientes de esos estadios (datos no mostrados).

En definitiva, es evidente que en los timos deficientes en EphB no se produce una recuperación de la celularidad linfoide como se ha observado en otros ratones con otros tipos de deficiencias en la colonización del timo, como es el caso de ratones doblemente deficientes en CCR7 y CCR9, donde, presumiblemente, un aumento de la proliferación de las células DN3 y DN4 recuperaba la celularidad tímica (Krueger y cols., 2010; Zlotoff y Bhandoola, 2011). Aquí, junto a un mayor índice de mortalidad y menor de proliferación, hay un retraso en la maduración de las distintas subpoblaciones linfoides tempranas respecto a las poblaciones WT.

El retraso en la maduración epitelial temprana correlaciona con las alteraciones observadas en la diferenciación linfoide

Las poblaciones epiteliales seguían, al igual que las linfoides, el mismo patrón de maduración en los timos WT y en los mutantes, como antes indicábamos, pero mostraban un retraso en ella que resultaba en porcentajes más altos en estos últimos, particularmente en el caso de los timos EphB2^{-/-} que, de nuevo, mostraban, en términos generales, un fenotipo más severo que los otros mutantes.

EphB2 y EphB3 han sido implicadas en el control del desarrollo epitelial (*Perez White y Getsios, 2014*) y nuestros resultados anteriores habían sugerido que la ausencia de estas moléculas generaba un retraso en la maduración del epitelio tímico, cuyos efectos se iban acumulando a lo largo del desarrollo hasta generar un severo fenotipo en el timo adulto específico de cada molécula ausente, aunque en ningún caso habíamos cuantificado la magnitud del retraso ni analizado en profundidad su origen (*García-Ceca y cols., 2009a*).

En primer lugar, nuestro estudio analizó los cambios en las células inmaduras MTS20⁺ y en las células MTS20⁻. Hay que adelantar que se conoce particularmente poco de los mecanismos que regulan la maduración de las TECs más primitivas. Por otro lado, hay que aclarar que las células MTS20⁺ no son consideradas actualmente como progenitores epiteliales tempranos pues las evidencias existentes al respecto son contradictorias (*Rossi y cols., 2007a*) (ver luego), por lo que preferimos hablar de células inmaduras, aunque son las células epiteliales predominantes en el primordio tímico de 12.5F, como ya habían constatado otros autores (*Bennett y cols., 2002*).

Los primeros estudios sobre la naturaleza de los progenitores epiteliales tímicos consideraron que estos correspondían a células que expresaban tanto marcadores corticales, K8, como medulares, K5, (*Klug y cols., 1998*), máxime cuando mutantes con bloqueo de la diferenciación T temprana (*Klug y cols., 1998*) o del desarrollo del epitelio (*Nehls y cols., 1996*), cursaban con acumulación de células K8⁺K5⁺. Nosotros también utilizamos estos marcadores para analizar los cambios morfológicos del epitelio durante la ontogenia tímica en ratones mutantes para EphB2 y/o EphB3, confirmando la temprana aparición en la zona central del primordio de células que expresaban K5 y K8 (*García-Ceca y cols., 2009a*). No obstante, se describió un

progenitor bipotente en el timo embrionario (*Gill y cols., 2002; Bleul y cols., 2006; Rossi y cols., 2006; Rodewald, 2008*) y adulto (*Bleul y cols., 2006*) cuya identificación es difícil debido a la falta de marcadores específicos. El anticuerpo MTS20 utilizado en el presente estudio, que reconoce el antígeno Plet-1 (*Depreter y cols., 2008*), y su equivalente MTS24 no parecen identificar todos los progenitores epiteliales tempranos (*Anderson y cols., 2009*), y se ha descrito que el potencial diferenciador reside tanto en las células MTS20⁺ como en las MTS20⁻ (*Rossi y cols., 2007a*). También en timo adulto se han descrito células MTS24⁺ en la médula, pero su función tampoco es clara (*Barthlott y cols., 2006*), y nosotros observamos una población K8⁺K5⁻MTS20⁺ de significado desconocido en timos de 17.5F y adultos que aumentaban en ratones deficientes en EphB (*Garcia-Ceca y cols., 2009a*).

Nuestros resultados actuales confirman que la población MTS20⁺ desciende gradualmente en el primordio tímico WT hasta 17.5F, en correlación con el aumento de la proporción de células MTS20⁻, lo que ya había sido puesto de manifiesto por otros autores (*Bennett y cols., 2002; Gill y cols., 2002; Rossi y cols., 2007a; Depreter y cols., 2008*). En cuanto a los timos mutantes, el porcentaje de células inmaduras MTS20⁺ es significativamente menor en todos ellos a 12.5F y luego, aunque como en los timos WT disminuyen gradualmente, el descenso era menor y los porcentajes de las células MTS20⁺ mutantes eran más altos que los de las WT en todos los estadios siguientes. Cuando se comparaban los timos mutantes entre sí no se observaban diferencias en los perfiles de evolución de las poblaciones MTS20⁺ y MTS20⁻ entre ratones EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, excepto a 14.5F; y a 15.5F, la acumulación de MTS20⁺ era mayor en los EphB2^{LacZ} que en los EphB2^{-/-}. En términos absolutos era patente, igualmente, el retraso de la maduración de las células MTS20⁺, retraso significativamente mayor en los mutantes EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}. Aunque sin realizar un estudio cuantitativo como el aquí presentado, ya habíamos señalado que junto con la reducción gradual experimentada por la población MTS20⁺ tanto en timos WT como mutantes, los timos deficientes en EphB mostraban mayor número de células MTS20⁺ (*Garcia-Ceca y cols., 2009a*). Hay que señalar aquí que ratones con mutaciones que afectan a distintas moléculas pero que resultan en fenotipos parecidos a los de los timos deficientes en EphB, muestran también retrasos en la maduración epitelial. Ratones que expresan Foxn1 sin su dominio amino terminal (*Su y cols., 2003*) y ratones

deficientes en Kremen, una molécula que regula la vía canónica de Wnt (*Osada y cols., 2006*) acumulan células $K8^+K5^+$. A este respecto hay que señalar de nuevo, que en el comportamiento del epitelio intestinal están estrechamente implicadas EphB2 y EphB3 junto con la vía de la β -catenina/TCF-4, a su vez, regulada por otra molécula de la familia Fox, FoxL1 (*Takano-Maruyama y cols., 2006*).

¿Cuales son los factores que determinan este comportamiento de las poblaciones epiteliales tímicas inmaduras? Independientemente de que cambios en la capacidad proliferativa y en la muerte de las TECs mutantes, que serán descritos luego en detalle y de los que ya habíamos publicado algunos resultados anteriormente (*Garcia-Ceca y cols., 2009a; 2013*), participen en estas modificaciones del número de TECs inmaduras, se asume que la llegada de progenitores al timo afecta el desarrollo epitelial (*van Ewijk y cols., 2000*). En este sentido, nuestros resultados indican que en ausencia de EphB los retrasos en la maduración de timocitos DN1, o el menor número de células $PIR^{A/B+}$ colonizadoras del timo temprano, correlacionan con una menor proporción de células $MTS20^+$ a 12.5F y un aumento y, por tanto un retraso, en las mismas desde 13.5F, lo que refuerza la idea de que el proceso podría ser dependiente de las interacciones entre timocitos y TECs, y dependientes de Eph y ephrinas-B. Esta hipótesis fue indirectamente confirmada bloqueando las interacciones Eph/ephrinas-B con proteínas de fusión solubles en lóbulos tímicos fetales cultivados. A 3 y 5 días tras el tratamiento, la diferenciación de la población $MTS20^+$ estaba bloqueada con la consiguiente acumulación de estas células y el aumento de sus proporciones. Además, evaluamos la relevancia de los timocitos en estos procesos, analizando la evolución de las poblaciones $MTS20^+$ en FTOCs derivados de timos WT o mutantes y en presencia o ausencia de timocitos (sin o tratados con 2'-dGuo), obteniendo resultados que refuerzan la idea de la relevancia de las interacciones timocitos-TEC en la maduración epitelial pero también que, al menos, algunos de los agentes implicados en esas interacciones eran Eph y ephrinas-B. Los lóbulos alinfoides, independientemente de que derivaran de timos WT o mutantes, acumulaban células $MTS20^+$, pero el incremento era significativamente mayor en los timos mutantes y en aquellos sin timocitos. Otros autores habían obtenido resultados semejantes pero analizando el comportamiento de poblaciones epiteliales más maduras. En un modelo similar al aquí

utilizado, FTOCs tratados con 2'-dGuo mostraban una reducción del porcentaje de mTECs maduras EpCAM⁺CD80⁺ (Rossi y cols., 2007c).

Independientemente de que se asuma en todos estos trabajos la relevancia de los timocitos para la maduración del epitelio tímico, hay cierta controversia acerca de si tales efectos se inician desde el mismo momento de la colonización de los progenitores linfoides o a partir de un determinado estadio de la maduración de los mismos. Mientras algunos estudios asumen que la aparición de los primeros progenitores linfoides en el timo marca el inicio de la diferenciación de las TECs (Bennett y cols., 2002; Gill y cols., 2002; Klug y cols., 2002), otros consideran que el *crosstalk* timocitos-TECs no se establece hasta 15F cuando aparecen los primeros timocitos DN3. Así, ratones transgénicos para la cadena ϵ del CD3 humano, hCD3etg26, que tienen bloqueada la maduración T en el estadio DN1 no son capaces de inducir la maduración de cTECs CD205⁺CD40⁺MHCII⁻, mientras que en timos Rag1^{-/-}, cuyos timocitos alcanzan el estadio DN3, tales cTECs pueden progresar al estadio maduro CD205⁺CD40⁺MHCII⁺ (Shakib y cols., 2009). También reagregados provenientes de timos 16.5F injertados en ratones doble KO Rag2/MHCII organizan un timo normal, concluyéndose que las células DN eran capaces de regular la formación de la médula tímica (Rodewald y cols., 2001). En ese mismo sentido, Gray y colaboradores (Gray y cols., 2006) han relacionado el desarrollo medular y su expansión con el aumento del porcentaje de timocitos SP, pero hay ratones con bloqueo temprano T que tienen tanto células K5⁺K8⁺ o CD205⁺CD40⁺ (Klug y cols., 2002; Shakib y cols., 2009) como células AIRE⁺ (Roberts y cols., 2009). Nuestros resultados, por el contrario, sugieren que ya timocitos DN1-DN2 podrían afectar la maduración temprana de las células MTS20⁺, cuando aún no hay células DN3. Más tarde, cuando las subpoblaciones DN1-DN2 han desaparecido prácticamente por completo, sustituidas por DN3, nuestros resultados también indican que comienzan a aparecer TECs que expresan marcadores de epitelio cortical, lo que confirmaría que la maduración del epitelio cortical depende de las subpoblaciones DN3-DN4.

Por tanto, estos son los primeros resultados que demuestran la importancia de las interacciones timocitos-TECs mediadas por Eph/ephrinas-B para el desarrollo temprano de la población de TECs inmaduras MTS20⁺. No obstante, y puesto que tanto timocitos como TECs expresan Eph y ephrinas-B (Alfaro y cols., 2008), revisamos si,

aparte de las interacciones timocitos-TECs, las que implican solamente a las TECs son también importantes para la maduración de las TEC MTS20⁺. En este caso, utilizamos FTOCs WT alinfoides que recibían proteínas de fusión solubles EphB2-Fc o ephrina-B1Fc para bloquear las interacciones Eph/ephrinas-B. De nuevo, bajo estas condiciones se acumulaban las células MTS20⁺ en los lóbulos, aunque el bloqueo era menos severo que el observado cuando las interacciones interrumpidas se establecían entre timocitos y TECs. Similares resultados se habían obtenido cuando se evaluó la supervivencia/apoptosis de TECs en mutantes deficientes en EphB (*García-Ceca y cols., 2013*) algo de lo que a continuación hablaremos.

Timos mutantes con celularidad reducida muestran mayor número de TECs apoptóticas a partir de 13.5F, pero no antes

Como ya hemos señalado para los timocitos, completamos trabajos anteriores sobre la viabilidad del epitelio tímico de ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3 estudiando su condición a 12.5F y 13.5F, y en timos EphB2LacZ, a fin de comprobar, una vez más, si las modificaciones en la supervivencia epitelial de los timos mutantes también contribuye a su hipocelularidad. Nuestros resultados confirman los anteriores (*García-Ceca y cols., 2009a; 2013*), indicando que a partir de 13.5F el porcentaje de TEC apoptóticas es más alto en los timos mutantes que en los WT.

Considerando que las células epiteliales reciben señales de muerte/supervivencia de su entorno sólo en determinados momentos y que muchos de nuestros resultados indican un retraso en su maduración, es factible interpretar que el menor porcentaje de TEC mutantes apoptóticas a 12.5F se deba a que un menor número de células han alcanzado el estadio en que reciben tales señales de muerte; en el siguiente, a 13.5F, cuando el porcentaje de apoptosis en las TEC WT desciende, en los mutantes los valores son todavía altos. No obstante, el número total de TEC apoptóticas en estos estadios es muy bajo de manera que presumiblemente su contribución al bajo contenido celular de los timos mutantes adultos sea menor que el de otros parámetros implicados en el proceso, como antes indicábamos para el compartimento linfóide.

Hay muy pocos trabajos referidos a la viabilidad del epitelio tímico y, particularmente, acerca del papel jugado en ella por las Eph o ephrinas. Cook (*Cook, 2010*) avanzó que la apoptosis en el epitelio tímico era baja sin considerar que las células apoptóticas son

rápida y eficazmente eliminadas del timo por macrófagos. Otras moléculas que han sido implicadas en la supervivencia epitelial en el timo son p63 (*Candi y cols., 2007; Senoo y cols., 2007*), Hoxa3, Pax1 (*Su y cols., 2001*) y BMP4 (*Gordon y cols., 2010*), pero desconocemos su posible relación con Eph y ephrinas. En el caso de p63, la conexión con EphB podría ser FGFR2IIIb, del que luego hablaremos, que es un *target* directo de esa proteína (*Dooley y cols., 2007*) y, en otros sistemas celulares, se activa por interacción Eph/ephrinas-B (*Park y cols., 2004; Yokote y cols., 2005*).

Aparte de nuestros trabajos sobre ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3 antes mencionados, ratones con ephrina-B1 y -B2 eliminadas específicamente en TECs muestran un elevado índice apoptótico que correlaciona con la baja celularidad epitelial observada en tales timos (*Cejalvo y cols., 2013*). Curiosamente, ratones deficientes en distintas moléculas que, como antes indicábamos, muestran un fenotipo similar al de los animales deficientes en EphB no sufren cambios en su muerte celular (*Osada y cols., 2006; Hauri-Hohl y cols., 2008; Zuklys y cols., 2009*). En general, el bloqueo de la señalización Eph-ephrinas cursa, como habíamos indicado al discutir la apoptosis en los timocitos mutantes, con un aumento de la apoptosis y la activación con disminución. RTOCs establecidos con TEC de 14.5F y timocitos totales WT mantenidos durante dos días en presencia de proteínas de fusión ephrina-B1Fc o EphB2-Fc sufren, con cualquiera de los dos tratamientos, un descenso del número de TECs en relación con un aumento de la proporción de TEC apoptóticas. También, comprobamos que en cualquier combinación en la que existieran células mutantes, TEC o timocitos, los RTOCs creados generaban menos TEC y mostraban un aumento de la muerte celular, inclusive cuando se utilizaban TEC EphB2LacZ, indicando que la señal *reverse* no era capaz en este caso de restaurar los niveles de viabilidad de las células control (*García-Ceca y cols., 2013*). En estos mismos experimentos comprobamos como la muerte epitelial es mayor en RTOCs establecidos exclusivamente con TEC que en aquellos a los que se añadía timocitos, indicando que las interacciones T-TEC contribuían a la supervivencia, presumiblemente, porque generaban factores de crecimiento/supervivencia que sólo el epitelio no es capaz de producir (*García-Ceca y cols., 2013*).

Menor número de TECs en ciclo contribuye también a la hipocelularidad observada en el timo de ratones deficientes en EphB

Los perfiles de proliferación de las TECs mutantes están íntimamente relacionados con el retraso en su maduración, como acabamos de indicar para el caso de la supervivencia. A diferencia de la clara importancia que el menor nivel de proliferación de los timocitos EpCAM⁺CD45⁺ mutantes tienen para el menor contenido celular de los timos deficientes en EphB, el patrón de proliferación de las TECs EpCAM⁺CD45⁺ no es homogéneo ni respecto a su evolución a lo largo de la ontogenia ni cuando se comparaban los distintos mutantes entre sí, especialmente EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, sugiriendo que no todas las TECs mutantes entran en ciclo al mismo tiempo, lo cual refleja muy bien el retraso en su maduración observado a 12.5F, consecuencia presumiblemente del menor número de timocitos en los timos mutantes muy tempranos. Esta relación entre ciclo celular epitelial y timocitos ha sido apuntada por otros autores. Así, en ratas, la proliferación de las TECs aumenta tras la colonización del primordio por la primera oleada de timocitos (*Brelinska y cols., 2001*).

En este trabajo demostrábamos una acumulación de células EpCAM⁺CD45⁺ EphB2^{-/-} a 12.5F y 13.5F que hacían sus valores tanto en porcentaje (**ver Fig. 17**), como en términos absolutos (**ver Fig. 20**) más altos que los WT, y a 13.5F en el caso de los EphB2LacZ, pero no en los EphB3^{-/-}, cuyos valores porcentuales eran iguales que los WT y los números absolutos significativamente menores desde 13.5F en adelante. Este retraso en la maduración celular de las TECs EphB2^{-/-} y EphB2LacZ hace que un porcentaje menor de células entren en ciclo que en los timos WT; en los EphB3^{-/-} simplemente el número de TEC es menor. En los siguientes estadios (13.5F a 14.5F) el porcentaje de las TECs totales mutantes en ciclo aumenta a medida que las WT comienzan a disminuir (de 13.5F en adelante). Se trata, por tanto, de dos formas de madurar desfasadas aproximadamente 24 horas. Consiguientemente, tanto en mutantes como en WT, la proliferación de las TECs contribuye a determinar la celularidad tímica pero lo hacen desfasados en el tiempo: los timos WT comienzan a proliferar antes, mientras que los mutantes lo hacen después. A 13.5F, aunque las TECs EphB2^{-/-} y EphB2LacZ se acumulan por encima de los valores WT (**ver Fig. 20**), el descenso del porcentaje de células en ciclo (**ver Fig. 142**) hace que sus valores

numéricos sean más bajos que los de los timos WT (**ver Fig. 143**). No obstante, no se puede establecer una correlación absolutamente lineal entre estos valores absolutos (y otros que luego discutiremos) y los descritos al hablar de la celularidad tímica en la primera parte de este trabajo porque, naturalmente, los animales estudiados son distintos y la variabilidad entre individuos, sobre todo en el caso de los mutantes, es importante.

Hay muy pocos datos sobre la evolución de la proliferación del epitelio tímico durante la ontogenia y los escasos estudios publicados se han ocupado de un estadio concreto o de muy pocos. Además, se han obtenido a partir de estudios realizados de acuerdo a protocolos muy distintos lo que ha generado resultados contradictorios particularmente en lo que se refiere al porcentaje de células en ciclo existente en cada estadio. Al igual que nosotros observamos en el presente estudio, otros autores cifran el pico proliferativo de las TEC a 13.5F (*Cook, 2010*) o 14F (*Jenkinson y cols., 2008*). Nuestros valores son, sin embargo, más bajos que los descritos en estos estudios (*Gray y cols., 2006; Cook, 2010*). La razón de esta discrepancia radica, probablemente, en diferencias a la hora de establecer el rango de células que están en ciclo. Por otro lado, algunos trabajos utilizan el marcador 7-AAD o la incorporación de BrdU, mientras nosotros hemos utilizado la tinción con Hoechst 33342. Algunos trabajos realizados *in vitro* midiendo la incorporación de BrdU a FTOCs mantenidos más o menos tiempo en cultivo dan valores mucho más altos (74% a 15F; 34% a 18F) (*Anderson y cols., 1998*), pero, en todo caso, se mantiene un patrón de evolución similar con valores altos en los estadios más tempranos seguidos de una gradual caída del número de TECs en ciclo.

Si los datos sobre proliferación de TECs en timos normales son escasos sólo nosotros habíamos abordado previamente el tema en los timos deficientes en Eph/ephrinas-B (*García-Ceca y cols., 2009a*), aunque en otros sistemas se había demostrado que EphB2 y EphB3 regulan la entrada en ciclo de progenitores epiteliales intestinales (*Holmberg y cols., 2006*). Concretamente, habíamos estudiado el nivel de proliferación de la fracción CD45⁻ total de timos de 15.5F deficientes en EphB2 y/o EphB3 en comparación con la existente en timos WT del mismo estadio. Los valores eran ligeramente más bajos en los dos timos mutantes en ese estadio, mientras en el presente estudio no hay diferencias significativas entre WT y mutantes o los valores son significativamente más altos, como en las TEC EphB3^{-/-}. Hay que señalar a este

respecto que las diferencias aunque significativas son realmente pequeñas y que al estudiar un solo estadio no se puede seguir la evolución de las proporciones de las TECs en ciclo, que nos dice, como ya hemos explicado, que mientras las TEC WT totales ya están dejando de ciclar a 15.5F con lo que sus proporciones bajan, las de los mutantes aún están altas, equilibrándose a 17.5F.

Para poder evaluar esta presunta correlación entre maduración epitelial y mayor o menor número de TEC en ciclo analizamos éste en las poblaciones epiteliales MTS20⁺ y MTS20⁻ puesto que hablar de células EpCAM⁺CD45⁻ no nos permite determinar de qué poblaciones estamos hablando y, por tanto, si las TEC que dividen son más o menos maduras.

La evolución del porcentaje de células MTS20⁺ en ciclo es muy similar al de la población epitelial total EpCAM⁺CD45⁻, lo cual no es de extrañar cuando se consideran los primeros estadios del desarrollo (12.5F y 13.5F) donde esta población epitelial es la predominante, pero, al mismo tiempo, indica que las células inmaduras MTS20⁺ siguen proliferando, aunque en menor medida (**ver Fig. 145**) en estadios posteriores cuando su representación porcentual y numérica se reducen extraordinariamente en el timo contribuyendo, por tanto, a la celularidad epitelial del órgano a lo largo de toda la ontogenia tímica. Esta evolución es muy similar a la descrita para la población Plet-1⁺, reconocida, como ya hemos indicado, por los anticuerpos MTS20 y MTS24 (*Cook, 2010*), salvo por las diferencias cuantitativas antes explicadas. También nuestros resultados coinciden con los de esta autora en el sentido de que la población Plet-1⁻ (MTS20⁻) en ciclo alcanza su máximo en los timos WT a 13.5F para luego disminuir.

Como interpretábamos para las TECs totales EpCAM⁺CD45⁻, de nuevo, el patrón de evolución de las MTS20⁺ en ciclo es muy similar en timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ y, ligeramente distinto de aquel de los EphB3^{-/-}. Es obvia la menor proporción de células inmaduras MTS20⁺ en ciclo en timos mutantes respecto a la condición WT. Como ya hemos indicado, el descenso de las proporciones de células MTS20⁺ a 12.5F se debía a la acumulación en los timos mutantes de células MTS20⁻ que serían aún más inmaduras que aquellas y no expresaban todavía el marcador (**ver Fig. 33, 34**). Consiguientemente, entraban en menor número en ciclo, lo que se confirmaba al estudiar la proporción de células MTS20⁻ proliferantes. En el estadio siguiente, el porcentaje y el número de células MTS20⁺ en ciclo aumenta pero menos en los timos

mutantes que en los WT por el retraso repetidamente mencionado. Aquí, el porcentaje de TECs en ciclo alcanza el máximo para luego comenzar a descender aunque siempre manteniéndose el desfase entre WT y mutantes (**ver Fig. 145**).

Es evidente, por tanto, la relevancia del grado de maduración de las poblaciones epiteliales más tempranas para establecer el marco de iniciación de la proliferación de las TECs. Cuando se analiza la evolución de la proporción de las células MTS20⁻ en ciclo (**ver Fig. 145**), se confirma el menor porcentaje en los timos mutantes de 13.5F y 14.5F para luego equilibrarse más con los valores WT a 15.5F (sólo más altos en los timos EphB3^{-/-}) y caer de nuevo significativamente a 17.5F. Naturalmente, la ausencia de MTS20 no nos permite conocer si a este menor porcentaje de células en ciclo contribuye o no de igual manera el epitelio cortical y el medular; algo que luego analizaremos.

Cuando en vez de considerar directamente el porcentaje de células MTS20⁺ en ciclo lo referíamos al porcentaje o número total de TECs en ciclo en el timo en cada estadio estudiado, el comportamiento de las poblaciones epiteliales mutantes resultaba más evidente. Con este análisis el retraso en la entrada en ciclo y su recuperación un día después aproximadamente en timos mutantes es más evidente (**ver Fig. 146**). Mientras a 12.5F todos los mutantes muestran porcentajes más bajos que los WT de células MTS20⁺ en ciclo, al día siguiente aumentan e inician después una caída más gradual que ellos, lo que resulta en valores más altos para los timos mutantes en los últimos estadios del desarrollo. No obstante, el retraso en la entrada en ciclo de las células mutantes y su menor número hace que en términos absolutos (**ver Fig. 147**) los valores de células MTS20⁺ mutantes en ciclo sean siempre menores.

El menor porcentaje de células MTS20⁻ en ciclo en la población epitelial total (**ver Fig. 146**) mutante se mantiene a todo lo largo de la ontogenia, de manera que en proporción, los timos WT alcanzan máximos para luego empezar a caer a partir de 15.5F, mientras los mutantes son siempre significativamente más bajos; eso hace que el número de células MTS20⁻ en ciclo desde 13.5F sea significativamente menor contribuyendo al bajo número de esta población observado en los timos mutantes (**ver Fig. 148**).

En resumen, todos estos resultados confirman que el porcentaje y número de TECs mutantes en ciclo son menores que los correspondientes de las células WT y, que eso

se debe a un desfase en la entrada de las primeras TECs en ciclo, consecuencia de su retraso en la maduración. Ello hace que no se iguale el porcentaje de células en ciclo hasta 15.5F, e incluso sea mayor a 17.5F, en el caso de las células MTS20⁺, que ya en ese estadio son minoritarias, y permanezcan significativamente inferiores en el de células MTS20⁻ que son cuantitativamente las más importantes contribuyendo a la caída de la celularidad epitelial y total de los timos mutantes. Comparativamente, por tanto, las células MTS20⁺ en ciclo contribuirían a la hipocelularidad epitelial en los primeros estadios del desarrollo mientras las MTS20⁻ lo harían desde 13.5F en adelante. Estas apreciaciones son más difíciles de percibir cuando se consideran los valores absolutos de células en ciclo de estas dos poblaciones epiteliales porque el número mucho menor de TEC en los mutantes hace que, independientemente de las variaciones en los porcentajes, siempre sean menores que los valores WT, salvo en los últimos días del desarrollo, pero entonces el número total de células MTS20⁺ es bajo en los timos mutantes. No obstante, es interesante describir estos valores porque “enseñan” muy bien las enormes diferencias numéricas entre las células que dividen en los timos WT y en los mutantes, explicando la enorme importancia que este parámetro tiene para la hipocelularidad de los timos deficientes en EphB.

Finalmente, analizamos el ciclo en las poblaciones definidas por la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1 que definen las poblaciones epiteliales corticales Ly51⁺UEA1⁻, y medulares Ly51⁻UEA1⁺ del timo adulto. En otra parte de este trabajo (**ver Fig. 43**) hemos analizado la evolución durante la ontogenia tímica de las poblaciones definidas por estos marcadores en animales WT y mutantes. En los estadios tempranos (12.5F) de los animales WT predomina la población Ly51⁻UEA1⁻, madurando primero la población cortical tras regular positivamente la expresión de Ly51 y al final del periodo embrionario la medular Ly51⁻UEA1⁺, con una población intermedia Ly51⁺UEA1⁺ que cobra mayor importancia también al final. La evolución de los timos mutantes es similar pero retrasada respecto del patrón WT como luego discutiremos.

En los primeros estadios del desarrollo en relación a sus respectivas subpoblaciones, las células WT que más ciclan son las Ly51⁻UEA1⁻, Ly51⁺UEA1⁻ y la Ly51⁺UEA1⁺ (**ver Fig. 150**); sin embargo, cuando los valores son referidos al total de la población epitelial las células Ly51⁻UEA1⁻ alcanzan los valores mayores (**ver Fig. 151**). Realmente, la población Ly51⁺UEA1⁺ es una población intermedia con un alto índice proliferativo, pero con

escasa incidencia para el ciclo del epitelio total. Así, $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ es la población predominante en los primeros estadios del desarrollo tímico con valores de ciclo muy altos a 12.5F y 13.5F respecto al epitelio total, descendiendo después. Los mutantes siguen un patrón similar pero con valores significativamente más bajos a 12.5F y ligeramente más altos a 14.5F, porque el retraso en la aparición de las poblaciones hace que la caída de los valores a partir de 13.5F sea más gradual que en los timos WT, lo que se confirma a 15.5F con valores significativamente superiores en los mutantes (**ver Fig. 151**). En términos absolutos, el patrón es similar pero como siempre el número total de células “enmascara” los resultados, de forma que el pico de células en ciclo tanto en WT como en los mutantes ocurre a los 14.5F, un día después de lo que indican las proporciones de células en ciclo. De nuevo, los valores mutantes están por debajo de los WT (**ver Fig. 152**). Como era de esperar, el comportamiento de esta población se asemeja enormemente al descrito para la población de células epiteliales inmaduras MTS20^+ (**ver Fig. 147**).

La segunda población en importancia para el total del epitelio en estas primeras etapas del desarrollo es la cortical $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$, que a 12.5F muestra en timos WT valores de células en ciclo más bajos que los de las células $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$, pero gradualmente aumenta alcanzando el máximo a 14.5F respecto al total de epitelio en ciclo y desciende más gradualmente a partir de ahí. Los valores mutantes son más bajos que los WT desde 12.5F a 14.5F, especialmente, en este último estadio (**ver Fig. 151**).

$\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ y $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ son poblaciones minoritarias al principio del desarrollo con un porcentaje de células en ciclo que contribuyen poco a la división del epitelio total (**ver Fig. 151**). Curiosamente, los valores de la población medular $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ mutante son, en general, más altos porque el retraso de su maduración hace que se acumulen células en ciclo cuando en los WT los valores van descendiendo desde el principio. Algo parecido sucede con la población $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ pero seguir su cinética es complicado porque se trata de un compartimento intermedio donde las células se convierten en $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ o, más difícilmente, reversionan a $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$.

En términos absolutos, como siempre, el mayor número de células de los timos WT enmascara los resultados, pero en líneas generales confirman los datos de los porcentajes de proliferación. En el caso de las células $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$, los valores mutantes son más bajos que los WT hasta 14.5F o 15.5F (**ver Fig. 152**) con enormes diferencias

entre WT y mutantes en la población cortical $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ (**ver Fig. 153**), que es la que en los estadios estudiados sufre expansión; mientras las diferencias en las poblaciones $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ (**ver Fig. 155**) y $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ (**ver Fig. 156**) se aprecian básicamente a partir de 14.5F o 15.5F, confirmando su mayor relevancia en estos estadios.

En resumen, es obvio que la importancia del ciclo de las TEC para la hipocelularidad observada en los timos mutantes se centra en las células $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$ y $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ hasta 14.5F-15.5F y luego prácticamente desaparece, mientras el ciclo de las poblaciones minoritarias $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ y $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$ tiene importancia desde 14.5F en adelante, cuando el retraso en la aparición de estas poblaciones hace que el porcentaje de células WT en ciclo haya caído y los valores mutantes son significativamente más altos. De estas tres poblaciones $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$, $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ y $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^+$, la primera corresponde básicamente a la que antes denominábamos MTS20⁺. Además, cuando se comparan entre sí los mutantes estudiados, en términos generales, los valores de las células en ciclo tanto del epitelio total $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$, como de las células inmaduras MTS20⁺ y $\text{Ly51}^-\text{UEA1}^-$, como de la población cortical $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$, no mostraban importantes diferencias, pero las proporciones de células epiteliales totales, MTS20⁺, $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^+$ y $\text{Ly51}^+\text{UEA1}^-$ en ciclo eran más bajas en los timos $\text{EphB3}^-/-$ que en los $\text{EphB2}^-/-$, aunque en términos absolutos las diferencias no existen o son mínimas.

Por otro lado, habría que señalar que la celularidad de los órganos y tejidos parece obedecer a dos modelos: uno, como sucede en el hígado, donde un bajo número de progenitores aumenta rápidamente por expansión; en el otro, la proliferación sólo compensa parcialmente el bajo número de progenitores. A este último modelo parece responder la organogénesis del páncreas y del timo que tienen otras semejanzas (*Munoz y cols., 2015*). En el caso del timo, los progenitores endodérmicos que determinan el primordio tímico tienen una capacidad de expansión limitada (*Jenkinson y cols., 2008*). La condición de los timos deficientes en EphB es todavía más compleja pues, como hemos demostrado aquí, el número de células MTS20⁺ es menor y su nivel de expansión también.

¿Cuáles son, en cualquier caso, los factores que regulan la proliferación del epitelio tímico y sus variaciones, si las hubiera, en los timos deficientes en EphB? Hace años se demostró la necesidad de mantener el mesénquima derivado de las crestas neurales

que rodea el timo y penetra en él en forma de trabéculas conectivas, para mantener la proliferación epitelial durante el desarrollo tímico (Auerbach, 1960; Jenkinson y cols., 2003). Después, se identificaron algunas moléculas producidas por el mesénquima que podían estar implicadas en el control de dicha proliferación, como IGF-1 e IGF-2 (van Buul-Offers y cols., 1995; Shinohara y Honjo, 1997; Jenkinson y cols., 2007b) y más tarde, moléculas de la superfamilia FGF y sus receptores (Revest y cols., 2001; Erickson y cols., 2002; Jenkinson y cols., 2003; Dooley y cols., 2007). Más recientemente, se demostraría que el mesénquima tímico manda realmente no sólo señales positivas si no también negativas para regular la proliferación del epitelio. El ácido retinoico, implicado en la regulación de la homeostasis de numerosos tejidos (Wang y cols., 2006) y necesario para la formación temprana del primordio tímico (Wendling y cols., 2000), regula negativamente la proliferación de las TECs, especialmente las cTEC durante el desarrollo (Sitnik y cols., 2012) downregulando la producción de proteínas que unen FGF (Aigner y cols., 2000) e inhibiendo la señalización BMP4 (Pendaries y cols., 2003) que, a través de FGF7, regula la proliferación epitelial (Rossi y cols., 2007b). FGFs, principalmente FGF7 y FGF10 producidas por el mesénquima tímico, pero algunas también por los timocitos, inducen en el epitelio la expresión de FGFR2IIIb (Erickson y cols., 2002). Esta molécula es esencial para las interacciones epitelio-mesénquima que acontecen durante el desarrollo de distintos órganos (Werner y cols., 1994; De Moerlooze y cols., 2000) y su eliminación cursa con hipoplasia tímica por bloqueo de la proliferación epitelial (Revest y cols., 2001). Ratones deficientes en FGF10 o FGF7 tienen fenotipos parecidos pero menos severos, sugiriendo que ambas moléculas no tienen funciones redundantes en el timo (Revest y cols., 2001).

Con estos datos en mente analizamos por qPCR la expresión de FGF7 y FGFR2IIIb en lóbulos totales, mesénquima o epitelio de ratones WT y deficientes en EphB. Mientras a 12.5F no había variaciones significativas entre timos WT y mutantes en cuanto a la expresión de FGF7, a 15.5F los valores mutantes eran significativamente menores que los WT. Los valores de los transcritos FGFR2IIIb eran significativamente menores en todos los mutantes a 15.5F y 7PN respecto a los WT, algo que comenzaba a observarse también en los timos EphB2-/- a 12.5F aunque de forma no significativa. Estudios previos cifran la aparición del receptor FGFR2IIIb el día 13.5F, aunque nosotros observamos sus transcritos ya un día antes. A partir de ese estadio, 13.5F, nuestros

resultados demuestran una caída drástica del número de células epiteliales en ciclo que en ese estadio corresponden principalmente a células inmaduras MTS20⁺ y Ly51⁻ UEA1⁻, aunque previamente también hay baja proliferación epitelial y los valores en mutantes de FGF7 y FGFR2IIIb no son significativamente bajos, sugiriendo que otras moléculas contribuyen también al proceso.

Como en ocasiones anteriores relacionar el descenso de la proliferación epitelial y el papel jugado en ella por FGF/FGFR2IIIb, y la ausencia de EphB no es fácil, aunque en este caso hay algunos datos interesantes. Como ya hemos señalado, en otros sistemas celulares las interacciones Eph/ephrinas activan receptores de FGF (*Park y cols., 2004; Yokote y cols., 2005*) y la falta de ephrina-B2 en células derivadas de la cresta neural afecta el comportamiento de su mesénquima (*Foster y cols., 2010*).

Otras moléculas, que no hemos estudiado en nuestro trabajo, parecen contribuir también a la proliferación epitelial tímica y tienen cierta relación con Eph y ephrinas. Como ya hemos indicado, la vía de señalización de Wnt es importante para la maduración del epitelio tímico y el bloqueo de su ruta canónica cursa con fenotipos parecidos a los aquí señalados para los timos deficientes en EphB (*Osada y cols., 2006*). La señalización constitutiva de β -catenina en TECs implica caída del número de células epiteliales en ciclo y de la expresión de FGFR2IIIb (*Zuklys y cols., 2009*). Igualmente, la falta de p63, una proteína clave para el mantenimiento de los progenitores epiteliales (*Candi y cols., 2007; Senoo y cols., 2007*), produce timos hipoplásicos fenotípicamente parecidos a aquellos deficientes en FGF10 o FGFR2IIIb, siendo este receptor *target* directo de p63 (*Dooley y cols., 2007*). También Stat3, otro factor de transcripción implicado en el control de la red epitelial y que se fosforila y activa por EphA4, EphB2 y EphB3 (*Lai y cols., 2004; Yuan y cols., 2004*), cuando es eliminado selectivamente en células epiteliales K5⁺ cursa también con hipoplasia (*Sano y cols., 2001*) y descenso del porcentaje de células mTEC MHCII^{hi}AIRE⁺ (*Lomada y cols., 2016*), algo también observado en nuestros mutantes.

Parece, por tanto, que el presumible descenso de la señalización a través del FGFR2IIIb de las TECs, debido a la menor expresión tanto del receptor como de su ligando FGF7, es clave para entender la reducción de las TECs en ciclo y de la celularidad tímica, en general.

El análisis fenotípico de las TECs a lo largo de la ontogenia tímica demuestra un retraso en la maduración de las poblaciones corticales y medulares de los timos mutantes que afecta también a la expresión de sus marcadores funcionales

El retraso en la maduración de las células MTS20⁺ de los timos deficientes en EphB se extendía también a otras poblaciones epiteliales tanto corticales como medulares, definidas por distintos marcadores incluidos algunos implicados en su funcionalidad. Los primeros marcadores analizados fueron Ly51 y UEA1, dos marcadores “clásicos” del epitelio cortical y medular, respectivamente. La expresión de Ly51 es temprana (12.5F-13.5F) y a 15.5F-17.5F aparecen las primeras células Ly51^{hi} y las UEA1 up-regulan rápidamente la molécula para llegar a ser UEA1^{hi}, pasando por una población intermedia UEA1^{lo/med} que co-expresa Ly51^{lo} o Ly51^{med} (**ver Fig. 43**). Con todo, a 12.5F la población predominante es la Ly51⁻UEA1⁻. Después del nacimiento, el predominio de las poblaciones medulares UEA1^{hi} es evidente frente a la baja representación de la proporción de células Ly51⁺. Este patrón ha sido descrito por otros muchos autores, aunque, en general, se han centrado en las poblaciones principales: Ly51⁺UEA1⁻ y Ly51⁻UEA1⁺ (Seach y cols., 2012; Dumont-Lagace y cols., 2014; Marrella y cols., 2014), sin hacer mención de los estadios intermedios, transitorios Ly51⁺UEA1⁺.

Respecto de las poblaciones corticales definidas por la expresión de Ly51 habíamos ya descrito *in situ* dos poblaciones en timo adulto (Cejalvo y cols., 2013). Las células Ly51^{hi} se concentran bajo la cápsula conectiva del órgano y forman una capa discontinua en el BCM, con algunas células distribuidas por toda la corteza, aunque aquí el predominio corresponde a células Ly51^{lo}. Por otro lado, la mayoría de las células Ly51^{hi} son MHCII⁺, DII4⁺ y podrían constituir el nicho de la población DN mientras la población Ly51^{lo}MHCII^{lo}DII4⁻ lo sería de los timocitos DP (Cejalvo y cols., 2013). Por otro lado, timos adultos con ephrinas-B1 y -B2 selectivamente delecionadas en timocitos o aquellos que no expresan ephrina-B2 en TEC, pierden la organización en empalizada típica del epitelio cortical y aparecen formando grupos que expresan homogéneamente Ly51 (Cejalvo y cols., 2013).

Aunque también habíamos descrito los cambios morfológicos que acontecen en distintas poblaciones epiteliales corticales y medulares en ratones deficientes en

EphB2 y/o EphB3, tales cambios no habían sido cuantificados y no conocemos ningún otro estudio que se haya ocupado de este tema. En el presente trabajo, la cinética de evolución de las poblaciones definidas por Ly51 y UEA1 es igual en los timos mutantes y en los WT, pero muestran un desfase importante en los primeros que genera valores en las distintas subpoblaciones unas veces más altos y otras más bajos en los mutantes que en los WT. Además, mientras los timos EphB2LacZ muestran fenotipos bastante similares a los WT, los EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} exhiben claras diferencias en su comportamiento y aunque las dos moléculas parecen necesarias para el desarrollo epitelial tímico, EphB2 parece más relevante que EphB3 para el desarrollo del epitelio medular y EphB3 para el cortical.

En concreto, los ratones mutantes EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} muestran un retraso en la maduración de las células corticales Ly51⁺ que son las primeras en madurar desde 12.5F a 17.5F. En los primeros estadios, la población más primitiva Ly51⁻UEA1⁻, que no expresa ninguno de los marcadores, tiene valores más bajos en los timos de 12.5F mutantes y más altos a 13.5F, lo que implica que en ese estadio las proporciones de células Ly51^{lo}UEA1⁻ también sean más bajas (**ver Fig. 45**). A partir de ese estadio, el retraso en la maduración epitelial de los timos deficientes en EphB se pone de manifiesto de varias maneras. En mutantes de 7PN cuando la corteza disminuye en los timos WT (*Dumont-Lagace y cols., 2014*) las células Ly51^{med} y Ly51^{hi} permanecen todavía altas (**ver Fig. 46**) y, por el contrario, las mTECs UEA1^{hi} mutantes sufren también un retraso a partir de 17.5F y sus valores son significativamente más bajos que los WT a 7PN cuando la médula expande (**ver Fig. 47**).

Combinando la expresión de estos marcadores con la de MTS20 evaluamos si el retraso en la maduración de las células Ly51⁺ mutantes que observamos al principio de la ontogenia tímica se debía a células inmaduras MTS20⁺ o a las MTS20⁻. En estos primeros estadios (12.5F-15.5F) sólo las poblaciones Ly51⁻UEA1⁻ y Ly51⁺UEA1⁻ juegan algún papel, tanto entre las células MTS20⁺ como en las MTS20⁻. La población más primitiva Ly51⁻UEA1⁻ predominaba a 12.5F y correspondía exclusivamente al compartimento MTS20⁺. Esta población disminuía rápidamente en los días siguientes a medida que aumentaban las células MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ y las MTS20⁻Ly51⁺UEA1⁻. Esta última población era la que más aumentaba a 14.5F y 15.5F. En estos últimos estadios analizados, la población MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁻ desaparecía y también disminuía la

población MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ en relación con el aumento de la MTS20⁻Ly51⁺UEA1⁺. Las poblaciones MTS20⁺UEA1⁺ que expresan o no Ly51 permanecen prácticamente igual hasta 15.5F y dentro del compartimento MTS20⁻ comienzan a aparecer con valores muy bajos a 15.5F (**ver Fig. 53**).

Las condiciones de estas poblaciones en los timos mutantes confirman el retraso en su maduración observado estudiando las poblaciones definidas en base a la expresión Ly51/UEA1. Dicho retraso se apoya en los siguientes puntos:

- 1) La población MTS20⁺Ly51⁻UEA1⁻ muestra mayores proporciones en todos los mutantes desde 13.5F, con ligeras diferencias entre ellos, porque la caída de los valores WT es mucho más rápida que la de las células mutantes. A 12.5F, el retraso hacía que el porcentaje de células fuera menor en los timos mutantes, aunque las diferencias no eran significativas (**ver Fig. 54**).
- 2) En el caso de la población MTS20⁺Ly51⁺UEA1⁻ su evolución refleja la de la población Ly51⁻UEA1⁻ y a 13.5F los valores mutantes son menores aumentando luego, pero sólo alcanzando diferencias significativas a 15.5F cuando los WT disminuyen (**ver Fig. 55**).
- 3) Dentro de la población MTS20⁻ las células Ly51⁺UEA1⁻ evidencian, de nuevo, un retraso a 15.5F cuando los valores mutantes no aumentan tanto ni tan rápido como los WT (**ver Fig. 56**).

No hay, como hemos indicado, estudios similares con los que comparar nuestros resultados; en ratones dobles deficientes en ephrinas-B1 y -B2 selectivamente eliminadas en TECs, un modelo parecido pero no igual al aquí mostrado, hay también un retraso en la maduración de las TEC corticales evidenciado por el retraso en la adquisición de Ly51. Además, en los timos WT la maduración cortical ocurre a través de un aumento de la expresión de Ly51 en células MTS20⁺Ly51^{lo}; por el contrario, en los deficientes, no había cambios en las proporciones de células MTS20⁺ dentro de cada subpoblación Ly51⁺ (*Cejalvo y cols., 2013*).

Una vez establecidas las diferencias principales entre las poblaciones corticales y medulares de los timos deficientes en EphB y los timos control, analizamos otros marcadores, tanto corticales como medulares, para confirmar los fenotipos observados y conocer si alguna población concreta y, particularmente, aquellas definidas por marcadores conocidos por ejercer funciones específicas en el epitelio

cortical o medular estaban afectadas en los timos mutantes. No hay, desgraciadamente, ningún dato en la literatura sobre este retraso en la maduración de estas poblaciones en timos deficientes en Eph o Ephrinas.

Retraso en la maduración de las poblaciones epiteliales corticales en ratones deficientes en EphB

En el caso del epitelio cortical combinamos la expresión de Ly51 con la de CD205. CD205 o DEC205 (*Jiang y cols., 1995*), como indicábamos antes, es una lectina tipo C de la familia de los receptores de manosa que empieza a expresarse en el timo fetal (*Shakib y cols., 2009*) participando en la captación de moléculas por endocitosis que después las cTEC presentan en el contexto de MHCI o II (*Bonifaz y cols., 2002*). Desde esta perspectiva, CD205 podría considerarse un marcador funcional del epitelio cortical pero su función no está claramente establecida y su ausencia curiosamente no afecta la maduración de los timocitos (*Jenkinson y cols., 2012*). Distintos estudios han proporcionado resultados contradictorios respecto del momento de aparición de este marcador durante la ontogenia. Mientras algunos autores la cifran entre 12.5F y 13.5F (*Shakib y cols., 2009; Baik y cols., 2013; Ribeiro y cols., 2013*), otros (*Saldana y cols., 2016*) lo sitúan un día después, entre 14.5F y 15.5F, al igual que nosotros.

Entre estos dos estadios, el porcentaje de células CD205⁺ dentro de la población epitelial tímica total EpCAM⁺CD45⁻ incrementa tanto en timos WT como mutantes, pero en éstos los porcentajes de células CD205⁺ son mucho más bajos en los dos estadios estudiados, particularmente en timos EphB3^{-/-}, cuyo fenotipo era, en este caso, más severo (**ver Fig. 59**). Cuando se combina la expresión de CD205 con la de Ly51, tanto en WT como en mutantes, se definen tres poblaciones: una que no expresa ninguno de los dos marcadores, otra Ly51⁺CD205⁻ presunta precursora de la tercera Ly51⁺CD205⁺ (**ver Fig. 60**). La evolución de estas dos últimas poblaciones ejemplifica muy bien el retraso en la maduración epitelial de los timos deficientes en EphB. Tanto a 14.5F como a 15.5F, los timos mutantes acumulan la población inmadura Ly51⁺CD205⁻, mostrando valores significativamente mayores que los timos WT, como ya hemos descrito para la población Ly51⁺UEA1⁻ total, al tiempo que mostraban porcentajes significativamente inferiores de células maduras Ly51⁺CD205⁺.

Nuevamente, la falta de EphB3 cursaba con el mayor retraso en la maduración de las poblaciones CD205⁺ (**ver Fig. 61**).

Con el análisis del comportamiento de las poblaciones CD40⁺ comenzamos a estudiar moléculas de funcionalidad conocida en el epitelio tímico. CD40 es una molécula co-estimuladora presente en las TEC maduras tanto corticales como medulares (*Shakib y cols., 2009; Ribeiro y cols., 2013*) que comienza a expresarse alrededor de 13.5F (*Shakib y cols., 2009*), dato en el que coinciden los presentes resultados. En los timos WT, CD40 y Ly51 definen distintas poblaciones cuya evolución durante la ontogenia coincide básicamente con la descrita por Ribeiro y colaboradores (*Ribeiro y cols., 2013*), aunque ellos en vez de Ly51 utilizan CD205 como marcador cortical de referencia. A 13.5F la población predominante es Ly51⁻CD40⁻ que desciende hasta desaparecer a 15.5F, en correlación con el aumento experimentado por la población CD40⁻Ly51^{lo} que también caerá, desapareciendo después del nacimiento. Todas las poblaciones maduras o casi maduras corticales, que expresan más o menos intensamente el marcador Ly51 (Ly51^{med}, Ly51^{hi}), medulares (Ly51⁻) y CD40^{med/hi} aumentan en los últimos estadios fetales en detrimento de las poblaciones intermedias, como CD40^{lo}Ly51^{med} (**ver Fig. 63**).

El estudio de estas poblaciones en los timos mutantes confirmaba el retraso en la maduración cortical ya observado para los marcadores Ly51 y CD205. La población más primitiva CD40⁻Ly51⁻ desciende en los timos mutantes, como en los WT, entre 13.5F y 15.5F pero mucho más lentamente, acumulándose una vez más en los mutantes (**ver Fig. 66**). En relación con esta acumulación de células CD40⁻Ly51⁻, los valores de la población CD40⁻Ly51^{lo} son, en general, menores a 13.5F y 14.5F para luego aumentar por encima de los valores WT cuando éstos caían mucho más rápidamente que los mutantes (**ver Fig. 67**). La evolución de las poblaciones intermedias que están up-regulando CD40 y Ly51, CD40^{lo}Ly51^{med} (**ver Fig. 70**) y CD40^{med/hi}Ly51^{med} (**ver Fig. 72**), es muy parecida, con valores significativamente más bajos que los controles en los primeros estadios y luego una maduración más lenta que acumula células, sobre todo CD40^{med/hi}Ly51^{med}, en los últimos estadios estudiados; algo que se observa aún más claramente en la evolución de la población cortical madura mutante CD40^{med/hi}Ly51^{hi} (**ver Fig. 73**). En el caso de la población medular, CD40^{med/hi}Ly51⁻, cuya maduración es muy posterior a la de la corteza, como ya se ha señalado, las diferencias entre timos

WT y mutantes sólo son apreciables después del nacimiento y conlleva un retraso de la maduración de las células mutantes con valores significativamente más bajos que los controles a 7PN (**ver Fig. 74**).

Si antes decíamos que en la expresión de CD205 la importancia de EphB3 era mayor que la de EphB2, el análisis comparado entre mutantes de las poblaciones definidas por la expresión de CD40 y Ly51, confirma este extremo. No se aprecian muchas diferencias entre los timos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ (**ver. Fig. 75**) y cuando existen, estos últimos se asemejan a los timos WT; por ejemplo, en el caso de la población CD40^{lo}Ly51^{med} (**ver Fig. 70**). Si se compara la evolución de los valores entre los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, las poblaciones más primitivas CD40⁻Ly51⁻ y CD40⁻Ly51^{lo} muestran un mayor retraso en su maduración en ausencia de EphB3 que de EphB2 (**ver Fig. 75F, G**); sin embargo, no hay diferencias cuando se consideran las poblaciones maduras CD40^{med/hi}Ly51^{hi} y CD40^{med/hi}Ly51⁻ (**ver Fig. 76G, H**). Es difícil analizar el significado de estos resultados porque las diferencias no son muy grandes, la variabilidad entre animales sí lo es y las poblaciones más primitivas e intermedias son compartimentos dinámicos en constante evolución.

En términos generales, el análisis de los datos sobre las poblaciones definidas por la expresión de MHCII y Ly51 confirmaba el retraso en la maduración epitelial de los timos mutantes, la necesidad de EphB2 y EphB3 para la culminación del proceso, cierta relevancia de la señal *reverse* mostrada por los timos EphB2LacZ y una ligera mayor severidad fenotípica cuando la molécula ausente es EphB3.

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores en cuanto a que MHCII, una molécula implicada en la selección positiva y negativa de los timocitos en desarrollo (*Manley y cols., 2011*), aparece pronto en el primordio tímico (*Nowell y cols., 2011*) y luego se va regulando positivamente durante el desarrollo (*Alves y cols., 2010; Ribeiro y cols., 2013*). El análisis de nuestros resultados en los timos WT indica que las distintas subpoblaciones definidas por la expresión de MHCII y Ly51 van, como decíamos, aumentando gradualmente durante el desarrollo y cayendo a continuación, cuando un porcentaje mayor o menor de células maduran al siguiente estadio. Así, en el primer estadio analizado, 12.5F, la población predominante es la más primitiva que no expresa ninguno de los dos marcadores estudiados, MHCII⁻Ly51⁻; esta población comienza a caer un día después, 13.5F, cuando la población predominante es MHCII⁻

Ly51^{lo}. A 14.5F, las poblaciones predominantes en los timos WT son la MHCII^{lo}Ly51^{lo} y la MHCII^{med}Ly51^{lo}. Un día después, 15.5F, estas poblaciones diferencian a MHCII^{med}Ly51^{med} y a 17.5F las células mayoritarias son MHCII^{hi}Ly51^{med}. En el periodo postnatal, las dos poblaciones corticales predominantes son las más maduras: MHCII^{hi}Ly51^{hi} y la MHCII^{hi}Ly51^{med} (**ver Fig. 78**).

El análisis de todas estas poblaciones en los timos mutantes nos ayuda a entender los cambios que se observan en los mismos. Quizás el retraso en la maduración epitelial que sufren los timos mutantes se aprecia particularmente bien en la población más primitiva MHCII^{lo}Ly51^{lo}, donde salvo a 12.5F, cuando esta población alcanza valores máximos en los timos WT, no hay diferencias, en el resto de los estadios las proporciones de células son significativamente más altas en todos los mutantes porque la gradual caída sufrida por la población, consecuencia de su maduración, es mucho más rápida en los timos WT. Al comparar los timos mutantes entre sí, aunque todos muestran igual perfil, el fenotipo EphB2LacZ es algo menos severo, como tantas veces hemos descrito en este trabajo (**ver Fig. 81**).

El mismo retraso se observaba en las dos poblaciones que alcanzan máximos en los timos WT a 14.5F, MHCII^{lo}Ly51^{lo} y MHCII^{med}Ly51^{lo}. Tras el aumento de 12.5F a 14.5F, las proporciones de células MHCII^{lo}Ly51^{lo} caen bruscamente en los timos WT y mucho más lentamente en los mutantes, lo que ocasionaba valores significativamente más bajos a 13.5F y 14.5F y luego más altos a 15.5F y 17.5F. En el caso de las células MHCII^{med}Ly51^{lo}, la condición es similar: valores mutantes significativamente muy bajos a 13.5F y 14.5F, y más altos a partir de entonces. También en el caso de estas poblaciones, el fenotipo EphB2LacZ es más parecido a los WT sin diferencias, por ejemplo a 14.5F, y algo más severo en EphB3^{-/-} que en EphB2^{-/-}, con mayor retraso en la maduración de las poblaciones EphB3^{-/-} a 15.5F (**ver Fig. 82**).

La acumulación en los timos mutantes de estas dos poblaciones MHCII^{lo}Ly51^{lo} y MHCII^{med}Ly51^{lo} hacen que la población MHCII^{med}Ly51^{med} a 14.5F tenga valores muy bajos y, aunque alcanza máximos en los timos WT un día después, 15.5F, los valores mutantes crecen mucho menos resultando significativamente más bajos. A 17.5F comienzan a bajar los valores WT mientras los EphB2LacZ y los EphB3^{-/-} continúan altos, y, sorprendentemente, los EphB2^{-/-} caen significativamente, posiblemente

porque muchas de estas células han madurado a la siguiente población MHCII^{hi}Ly51^{med} (ver Fig. 83).

Los retrasos en la maduración de los timos mutantes vuelven a ponerse de manifiesto en la población MHCII^{hi}Ly51^{med}, con valores más bajos a 14.5F. En los siguientes estadios todas las poblaciones aumentan más lentamente en los timos EphB2LacZ y, especialmente, en los EphB3^{-/-}, pero no en los EphB2^{-/-} que, de nuevo, muestran valores control desde 15.5F a 7PN, lo que podría indicar, aunque la variabilidad entre muestras es importante y hace difícil alcanzar conclusiones definitivas, que la ausencia de EphB2 no afecta la aparición de esta población cortical casi madura, lo cual no quiere decir que su señal *forward* no sea necesaria durante su maduración (ver Fig. 83).

Las células maduras MHCII^{hi}Ly51^{hi} WT van aumentando de 15.5F a 7PN. En los estadios fetales, los valores mutantes son significativamente más bajos que los WT, pero tras el nacimiento las proporciones son mayores porque el descenso de la zona cortical que ya ha comenzado en los timos WT no lo ha hecho aún en los mutantes (ver Fig. 83). Las poblaciones presumiblemente medulares MHCII^{med}Ly51⁻ y MHCII^{hi}Ly51⁻ mostraban a 7PN valores significativamente menores en los timos mutantes, porque en éstos no se ha iniciado la expansión medular que ocasiona la reducción del área cortical, antes indicada (ver Fig. 84).

El último marcador cortical analizado en esta serie de estudios sobre la evolución ontogenética del epitelio tímico en ratones deficientes en EphB es $\beta 5t$, una molécula que forma parte del llamado timoproteosoma (Ripen y cols., 2011), implicada en la generación del repertorio inmune de células T CD8⁺ restringidas en el contexto de MHCII (Nitta y cols., 2010) y que se expresa específicamente en células epiteliales corticales (Murata y cols., 2007). Así, ratones deficientes en $\beta 5t$ muestran una fuerte reducción del porcentaje de timocitos CD8 y los pocos que se mantienen, muestran alteraciones en sus respuestas a distintos estímulos (Murata y cols., 2007). Aparte de estos datos, las poblaciones corticales concretas que expresan $\beta 5t$, los timocitos en desarrollo a los que se asocian o su distribución exacta en la corteza tímica son desconocidos.

Durante el desarrollo, otros autores han demostrado expresión temprana de la molécula a 12.5F (Ripen y cols., 2011). Utilizando un anticuerpo policlonal comercial,

distinto del utilizado por Ripen y colaboradores, e inmunohistoquímica observamos algunas células positivas, pero por citometría de flujo no lo conseguimos antes de 13.5F y aún en este estadio la expresión es muy débil. Anticuerpos similares a los aquí utilizados han sido usados para citometría por otros autores (*Wong y cols., 2014*) pero sólo en timos adultos. No obstante, el análisis por qPCR de lóbulos tímicos de 12.5F demuestra la presencia de transcritos específicos de $\beta 5t$ tanto en lóbulos WT como mutantes.

En estos estudios inmunohistoquímicos, la expresión de $\beta 5t$ se extendía, en nuestro caso, por todo el primordio tímico de 12.5F y 13.5F. Curiosamente, fuera del timo observamos células $\beta 5t^+$ en el epitelio esofágico, algo que ya habíamos visto en la faringe de embriones de 18F en otros estudios sobre el desarrollo tímico (*Juara, 2015 TFM*) y, cuyo significado, es de momento desconocido pero sugiere que esta molécula podría no ser tan específica del timoproteosoma como se pensaba. La condición de los timos mutantes respecto a la expresión de $\beta 5t$ es similar a la de los WT y la cuantificación de las células positivas en las secciones no muestra diferencias entre timos WT y mutantes en los primeros estadios estudiados, 12.5F y 13.5F (**ver Fig. 88**), lo que confirmamos por qPCR en lóbulos WT y mutantes de 12.5F; a 15.5F y 7PN los transcritos disminuían en las TECs mutantes pero sin diferencias significativas respecto a los valores WT salvo en las células EphB2^{-/-} a 7PN. Sin embargo, tanto a 15.5F como a 17.5F todos los timos mutantes mostraban valores significativamente más bajos que los WT particularmente, de nuevo, en el caso de aquellos deficientes en EphB3, tras el estudio por citometría de flujo (**ver Fig. 90**). Estos resultados de citometría sugerían otra interesante interpretación. Como hemos indicado en la Introducción de este trabajo, las células $\beta 5t^+$ podrían tener capacidad para generar no sólo TECs corticales sino también medulares (*Baik y cols., 2013; Ohigashi y cols., 2013; 2015*). Cuando se analizó la proporción de células $\beta 5t^+$ en la población Ly51⁻, presumiblemente medular, observamos que la ausencia de EphB2, más que la de EphB3 que acumulaba menor porcentaje de estas células, parece impedir la maduración de estos progenitores con capacidad de dar células medulares, resultando en la acumulación de su porcentaje (**ver Fig. 91B**); en presencia de EphB2 consiguientemente, estas células regularían negativamente la expresión de $\beta 5t$ y terminarían su maduración a mTEC.

El resumen de todos estos resultados es que hay un retraso claro en la maduración de las poblaciones epiteliales corticales en los timos deficientes en EphB que son más severos en aquellos deficientes en EphB3, aunque la presencia de EphB2 es también imprescindible para alcanzar un desarrollo cortical normal, y menos en aquellos que expresan EphB2LacZ indicando que la señal *reverse* mediada por esta EphB2 truncada mejora la condición del epitelio cortical, en algunos casos, aún sin llegar a recuperar totalmente el fenotipo WT.

Retraso en la maduración de las poblaciones epiteliales medulares en ratones deficientes en EphB

Como para analizar la evolución de las poblaciones epiteliales corticales, para evaluar la aparición y evolución de las distintas poblaciones epiteliales medulares en timos WT, y sus variaciones respecto de ese patrón en los timos deficientes en EphB utilizamos marcadores específicos, como UEA1, MHCII, CD80 y AIRE, algunos de funcionalidad conocida. Estos, junto con CCL21, son los marcadores más utilizados en la caracterización de las subpoblaciones epiteliales medulares tímicas (*Gabler y cols., 2007; Shakib y cols., 2009; Lkhagvasuren y cols., 2013*).

La aparición de las mTECs es más tardía que la de las células epiteliales corticales, como ya adelantábamos al discutir la evolución de las poblaciones definidas por los marcadores Ly51 y UEA1; por ello, nuestro estudio se inició en este caso a 13.5F e, incluso, más tarde. No obstante, la aparición de una población Cld3,4⁺ considerada precursora del epitelio medular aparece muy temprano cuando aún el primordio tímico está unido al endodermo faríngeo (*Hamazaki y cols., 2007*). Respecto de las poblaciones definidas por la expresión de MHCII y UEA1, a 13.5F, la expresión de MHCII está asociada a la población UEA1⁻, correspondientes a células corticales que también expresan estas moléculas y lo hacen muy pronto como ya hemos discutido, aunque este estadio corresponde predominantemente a una población más primitiva MHCII⁻UEA1⁻ que cae rápidamente hasta 15.5F para desaparecer a 17.5F. Esta desaparición se corresponde, al principio del desarrollo, con las poblaciones corticales UEA1⁻ que van regulando la expresión de MHCII apareciendo y desapareciendo secuencialmente, como ya habíamos apuntado: a 14.5F, MHCII^{lo} y MHCII^{med}, a 15.5F MHCII^{med} y, en menor medida, MHCII^{hi} (**ver Fig. 93**).

Las poblaciones medulares $UEA1^{lo/med}$ y $UEA1^{hi}$ comienzan a aparecer a 15.5F ascendiendo rápidamente. Las poblaciones inmaduras $UEA1^{lo/med}$ aumentan a 17.5F expresando en mayor o menor medida MHCII ($MHCII^{hi}$ y $MHCII^{med}$), y luego caen, mientras las más maduras $UEA1^{hi}$, $MHCII^{med}$ y $MHCII^{hi}$, continúan ascendiendo, sobre todo esta última que se convierte en la población predominante a 7PN (**ver Fig. 93**), no sólo entre las poblaciones medulares que expresan UEA1 si no incluso respecto a las corticales $Ly51^{hi}$ que representan en este estadio alrededor de un 20% del total del epitelio tímico (**ver Fig. 83D**).

Al igual que describimos en la población $MHCII^{-}Ly51^{-}$, la población $MHCII^{-}UEA1^{-}$ se acumula en los timos mutantes mostrando valores significativamente más altos que los WT en todos los estadios analizados (**ver Fig. 95**). Respecto de las dos poblaciones WT predominantes a 14.5F y 15.5F, $MHCII^{lo}UEA1^{-}$ y $MHCII^{med}UEA1^{-}$ respectivamente, la acumulación de la población más primitiva $MHCII^{-}UEA1^{-}$ hacía que, tanto a 13.5F como a 14.5F, los valores mutantes fueran significativamente más bajos que los WT. A 15.5F, la población $MHCII^{lo}UEA1^{-}$ mostraba valores significativamente más altos porque en la WT ya han caído, mientras la $MHCII^{med}UEA1^{-}$ todavía es significativamente menor en los tres mutantes para igualarse todos los valores a 17.5F. El retraso de la maduración del epitelio mutante es, de nuevo, evidente en la población cortical más madura $MHCII^{hi}UEA1^{-}$, que a 15.5F muestra valores significativamente más bajos y a 17.5F más altos en los mutantes (**ver Fig. 96**). Todos estos resultados confirman lo antes descrito para la población cortical definida por la expresión de MHCII y Ly51.

Las poblaciones $UEA1^{lo/med}$ WT rápidamente up-regulan la expresión de MHCII: desde 15.5F a 7PN no dejan de subir las proporciones de células $MHCII^{med}UEA1^{hi}$ y, sobre todo, $MHCII^{hi}UEA1^{hi}$ (**ver Fig. 93**). La maduración de las células $MHCII^{med}UEA1^{lo/med}$ mutantes muestran retraso tanto a 17.5F como a 7PN y más acusado en los timos $EphB2^{-/-}$ que en los $EphB3^{-/-}$ (**ver Fig. 97A**).

Hay que entender estos resultados en el contexto de lo que muchos autores denominan poblaciones “low” y “high” corticales y medulares, considerándose $cTEC^{lo}$ las células $MHCII^{med}UEA1^{-}$ y las $cTEC^{hi}$, las $MHCII^{hi}UEA1^{-}$, lo que según nuestro análisis citométrico equivaldría a $MHCII^{med}UEA1^{lo/med}$ y $MHCII^{hi}UEA1^{lo/med}$ respectivamente; mientras las $mTEC^{lo}$ son células $MHCII^{med}UEA1^{hi}$ y las $mTEC^{hi}$, las $MHCII^{hi}UEA1^{hi}$ (Seach y cols., 2012). Por otro lado, las poblaciones $cTEC^{lo}$, $MHCII^{med}UEA1^{lo/med}$, pueden

diferenciar a cTEC^{hi} y, presumiblemente, a mTEC^{lo}, mientras esta última población dará mTEC^{hi}, un compartimento celular al que también contribuyen las células cTEC^{hi}. Puesto que la corteza tímica crece aproximadamente hasta 17.5F para disminuir tras el nacimiento y, por el contrario, la médula lo hace desde 17.5F y, especialmente, en el periodo postnatal, hasta el estadio 17.5F las células cTEC^{lo} siguen en su diferenciación predominantemente la ruta cTEC^{lo} → cTEC^{hi} → mTEC^{hi} frente a la que incrementaría fundamentalmente la médula, cTEC^{lo} → mTEC^{lo} → mTEC^{hi}; tras el nacimiento la condición sería la opuesta. A 17.5F en los timos WT la población predominante son las células cTEC^{lo} (**ver Fig. 97A**), seguida de la mTEC^{hi} (**ver Fig. 98B**), que recibe células de los otros dos compartimentos cTEC^{hi} y mTEC^{lo} que muestran, consiguientemente, los valores más bajos. En los timos mutantes la condición es similar pero los valores de cada población reflejan el retraso en su maduración. A 17.5F, las proporciones de cTEC^{lo} son significativamente más bajas que la de los WT (**ver Fig. 97A**) y las de cTEC^{hi} las más altas (**ver Fig. 97B**), porque no maduran hasta la población mTEC^{hi} que también exhiben valores más bajos que los timos WT (**ver Fig. 98B**). Por supuesto, la falta de diferenciación de las pocas cTEC^{lo} a mTEC^{lo} hace que esta última población tenga los valores más bajos de los mutantes en este estadio (**ver Fig. 98A**). A 7PN la condición cambia, los valores de cTEC^{lo} son significativamente más bajos sólo en los timos EphB2^{-/-} (**ver Fig. 97A**) pero su diferenciación a cTEC^{hi} es ahora mucho menor que en los timos de 17.5F, y mutantes y WT muestran valores similares (**ver Fig. 97B**), mientras en este caso, la diferenciación predominante es a mTEC^{lo} cuyas proporciones aumentan significativamente respecto a los valores WT (**ver Fig. 98A**) y, aunque hay una alta producción de células mTEC^{hi}, cuyas proporciones son ahora mucho mayores que a 17.5F, los valores mutantes siguen siendo bajos (**ver Fig. 98B**). Hay que señalar que en todas estas poblaciones, los mutantes EphB3^{-/-}, como ya hemos repetido para otras poblaciones medulares definidas mediante otros marcadores, se comportan mucho más parecido a los WT que EphB2^{-/-}, sugiriendo que su falta afecta menos a la maduración del epitelio medular. Parece evidente que, justo al contrario, de lo que observábamos en la maduración del epitelio cortical, la maduración del epitelio medular parece mucho más dependiente de la presencia de EphB2 que de EphB3.

CD40 y CD80 son dos moléculas co-estimuladoras que definen distintas poblaciones en el epitelio medular, aunque, como ya hemos visto, CD40 también se expresa en el

cortical (*Shakib y cols., 2009*). CD80 define, al final de la vida fetal y, sobre todo, después del nacimiento una población de mTEC maduras (*Gabler y cols., 2007*) de manera que en combinación con MHCII y AIRE se definen tres poblaciones: células inmaduras MHCII^{lo}CD80^{lo}AIRE⁻; maduras MHCII^{hi}CD80^{hi}AIRE⁺, y células denominadas terminales MHCII^{lo}CD80^{lo}AIRE⁻Involucrina⁺ (*Rossi y cols., 2007c; Nishikawa y cols., 2010; Wang y cols., 2012*), aunque la existencia de esta última población es cuestionada y hay autores que consideran que las mTECs maduras son células postmitóticas que finalmente mueren (*Gray y cols., 2007*). Otros consideran que continúan diferenciando hasta integrarse en corpúsculos de Hassall, perdiendo la expresión de AIRE y, con ello, las de MHCII y CD80 y ganando la de involucrina, un marcador de epitelios epidérmicos maduros (*Wang y cols., 2012*).

A 17.5F las proporciones de células CD40⁻CD80⁻ WT ya son muy bajas porque la población predominante en ese estadio expresa débilmente CD40; no obstante, también esta población disminuirá rápidamente tras el nacimiento en coincidencia con el aumento de las proporciones de células CD40^{med/hi}CD80⁻ y de la población madura CD40^{med/hi}CD80⁺ (**ver Fig. 101**). Es decir, que en este estadio se distinguen en nuestros timos las mismas poblaciones: tres CD40 (CD40⁻, CD40^{lo}, CD40^{med/hi}) y dos CD80 (CD80⁻ y CD80⁺) apuntadas por otros autores y se confirma que la aparición de TEC CD80⁺ acontece sólo en la población CD40^{med/hi} (*Ribeiro y cols., 2013*).

En los timos mutantes, este patrón WT mostraba alteraciones que nuevamente sugieren el retraso en la maduración de su epitelio medular. La caída de los porcentajes de células observadas en las primeras poblaciones, CD40⁻CD80⁻ y CD40^{lo}CD80⁻ WT, es menos acusada en los mutantes y, particularmente, en los deficientes en EphB2, que acumulan células de las dos subpoblaciones; por el contrario, el porcentaje de células maduras CD40^{med/hi}CD80⁺ es significativamente menor en los tres mutantes y más acusado en aquellos deficientes en EphB2, mientras la población inmadura CD40^{med/hi}CD80⁻ se comportaba como una población intermedia que rápidamente regulaba positivamente la expresión de CD80 y no mostraba diferencias entre timos WT y mutantes (**ver Fig. 103**).

Finalmente, AIRE es un factor de transcripción regulador de autoinmunidad (*Derbinski y cols., 2001; Mathis y Benoist, 2009*) que se expresa en un pequeño número de mTECs (*Palmer, 2003; Derbinski y cols., 2008*), y contribuye a la expresión en ellas de múltiples

auto-antígenos tisulares que han de ser reconocidos por los timocitos seleccionados positivamente en la corteza tímica, procediendo a su eliminación en caso de fuerte interacción en el complejo formado por TcR-péptido-MHCII (*Hubert y cols., 2011*). Durante el desarrollo, las células AIRE⁺ parecen generarse a partir de progenitores Cld3,4⁺ que ocurren en el epitelio biestratificado del rudimento tímico de 10.5F (*Hamazaki y cols., 2007; Munoz y cols., 2015*). A pesar de la relevancia de esta molécula, los datos aquí descritos son los primeros que la relacionan con Eph o ephrinas.

Nuestro análisis morfométrico sobre secciones tímicas WT y mutantes de 17.5F y 7PN, demuestra en ambos tipos de timos que las células AIRE⁺ se distribuyen aparentemente al azar por toda el área medular en menor número a 17.5F que a 7PN; sin embargo, ya a 17.5F el número relativo de células AIRE⁺ por mm² de sección es significativamente menor en timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-} pero no en los EphB2LacZ, para a 7PN también estos últimos mostrar valores más bajos, que vuelven a ser menores en timos EphB2^{-/-} respecto a los EphB3^{-/-}, debido al retraso en su maduración.

Como hemos indicado en varios apartados de este trabajo al final de la vida fetal y comienzo de la postnatal, el epitelio medular aumenta en detrimento del cortical, cuyo porcentaje desciende significativamente. Este fenómeno es consecuencia de la expansión de los focos epiteliales medulares que hasta entonces constituyen pequeñas médulas dispersas y han de aumentar para fusionarse en la gran médula central de los timos adultos (*Irla y cols., 2013; Dumont-Lagace y cols., 2014*). Sin embargo, como ya habíamos descrito, en timos deficientes en EphB no parece suceder tal agregación y las áreas medulares permanecen más o menos dispersas (*García-Ceca y cols., 2009a*). Los presentes resultados han confirmado esta situación. Así, el análisis histológico de RTOC tratados con anticuerpos inhibidores anti-EphB2 o anti-EphB3 o con controles isotípicos muestra más áreas medulares K5⁺ y más pequeñas en los reagregados tratados, algo que, también se confirma cuando se compara la condición de RTOCs establecidos con células WT o deficientes en EphB2 o EphB3. La cuantificación de estos resultados confirma el mayor número de áreas medulares y su menor tamaño en los RTOCs mutantes o tratados con anticuerpos. El número de áreas es, además, significativamente mayor en RTOCs establecidos con células EphB2^{-/-}, algo ya

apuntado en nuestro estudio histológico preliminar donde destacábamos el pequeño tamaño de las áreas medulares de los timos EphB2^{-/-} (García-Ceca y cols., 2009a).

Estos resultados apoyan, una vez más, el retraso en la maduración del epitelio medular en los timos mutantes que culmina con su menor expansión al final del desarrollo, en correlación con un número mucho menor de células en división y la mayor severidad del fenotipo medular en los mutantes EphB2^{-/-}.

Diferenciación de progenitores epiteliales WT y mutantes definidos por la expresión de nuevos marcadores

El tradicional modelo propuesto para explicar la ontogenia del epitelio tímico a partir de un progenitor bipotencial presente en el primordio tímico que diferencia simétricamente, directamente o a través de precursores comprometidos, dando lugar a las subpoblaciones corticales y medulares (Gill y cols., 2002; Bleul y cols., 2006; Rossi y cols., 2006; Rodewald, 2008), ha sido cuestionado recientemente con la identificación de poblaciones intermedias, que expresando marcadores considerados corticales, daban *in vivo* e *in vitro* tanto cTEC como mTEC (Alves y cols., 2014) proponiéndose nuevos modelos de diferenciación asimétricos. Así, células CD205⁺CD40⁻ trasplantadas *in vivo* dan cTEC CD205⁺β5t⁺ y mTEC AIRE⁺ (Baik y cols., 2013) y RTOCs establecidos con TEC IL7⁺ generan cTEC Ly51⁺CD205⁺ y mTEC CD80⁺, mientras aquellos constituidos con TEC IL7⁻ sólo daban epitelio medular (Ribeiro y cols., 2013). Otros autores han conseguido diferenciar directamente cTEC β5t⁺ a mTEC (Ohigashi y cols., 2013; 2015). Además, mTECs que expresan niveles intermedios de CCRL1 podrían derivar de un progenitor que expresara marcadores corticales (Alves y cols., 2014).

Todos estos nuevos datos han conducido a la búsqueda de nuevos marcadores para caracterizar mejor estas poblaciones y poder estudiar su diferenciación y, por tanto, los hemos incluido en nuestro estudio. De hecho, nuestros resultados demuestran la existencia de muchas poblaciones que, al menos temporalmente, expresan simultáneamente marcadores corticales y medulares, aunque no fuimos capaces de demostrar sus capacidades de diferenciación (ver luego). No obstante, también es posible que la expresión de estas moléculas refleje simplemente estadios intermedios sin significado funcional alguno. Así, otros trabajos han demostrado que la falta de β5t

(Murata y cols., 2007; Nitta y cols., 2010), de CD205 (Jenkinson y cols., 2012) o de IL7 (Alves y cols., 2014) no afecta el desarrollo de las mTEC AIRE⁺.

En este trabajo hemos estudiado la población de presuntos progenitores medulares MTS20^{hi}Cld3,4^{hi}, así como las Cld3,4^{hi}SSEA1⁺, α6⁺Sca-1⁺ y Podoplanina (PDPN⁺). En primer lugar, analizamos la evolución de la población MTS20^{hi}Cld3,4^{hi}, como posible progenitor comprometido exclusivamente con el epitelio medular. Aunque, como ya hemos descrito, MTS20 se expresa por todo el primordio tímico a 12.5F, y las Cld3,4 se localizan aún antes en el borde apical del epitelio faríngeo evaginado que da lugar al timo (Hamazaki y cols., 2007), en el centro del primordio a 12.5F hay células que expresan más intensamente MTS20 y que co-localizan con Cld3,4. La evolución de esta población es similar a la descrita para las células Cld3,4 por otros autores (Hamazaki y cols., 2007): a 13.5F las células MTS20⁺ se disponen en pequeños focos, algunos de los cuales también expresan co-expresan Cld3,4; a partir de ese estadio, la proporción de células MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} “se diluye” hasta prácticamente desaparecer a 15.5F. Curiosamente en los mutantes a partir de 14.5F y, más claramente, a 15.5F la proporción de esta población aumenta sugiriendo que su diferenciación se retrasa produciendo su acumulación.

Analizamos también esta subpoblación en timos postnatales en los que se ha descrito una expansión de células Cld3,4⁺ (Hamazaki y cols., 2007). Efectivamente, nuestros resultados confirman este hecho mostrando mayor número de células Cld3,4⁺ en timos WT postnatales que en timos 15.5F. Sin embargo, no constituyen una población homogénea, distinguiéndose células Cld3,4^{hi} y otras Cld3,4^{lo/med} y siendo, por otra parte, la mayoría MTS20⁻. Aquí, cuantificamos el número de células Cld3,4^{hi} totales respecto a la sección tímica total observando un número relativo menor en los timos EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero no en los EphB2LacZ, confirmando la menor expansión postnatal sufrida por las células Cld3,4^{hi} en los timos deficientes en EphB2 o EphB3.

Las células Cld3,4^{hi}SSEA1⁺ corresponden a una subpoblación de progenitores Cld3,4^{hi} que expresa el marcador de células madre embrionarias SSEA1. Esta población con capacidad de auto-renovación, clonogénica y capaz de producir específicamente mTEC, aparece pronto en la ontogenia, a 14.5F, antes de que la médula exprese RANK, necesario para la maduración de su epitelio, y pierde sus capacidades poco después del nacimiento (Sekai y cols., 2014; Alves y Ribeiro, 2016). En nuestros timos WT, la

proporción de células Cld3,4⁺SSEA1⁺ aumenta entre 14.5F y 17.5F. En los tres mutantes, por el contrario, las células se acumulan a 14.5F mostrando valores más altos que los WT para luego igualarse todos a 17.5F sugiriendo un retraso en la maduración del epitelio mutante.

A diferencia de las células Cld3,4⁺SSEA1⁺, la población progenitora $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi} tiene capacidad de diferenciación tanto a cTEC como a mTEC y ocurre, principalmente en timos postnatales y adultos (*Wong y cols., 2014*). A pesar de esta capacidad para generar mTEC, las células constituyen una subpoblación dentro de las células corticales inmaduras MHCII^{lo}UEA1⁻.

Utilizando estos marcadores, que se han usado para identificar progenitores en otros epitelios (*Welm y cols., 2002; Terunuma y cols., 2007; Hayashi y cols., 2008; McQualter y cols., 2010*), se observa que antes del nacimiento, a 17.5F, aunque hay algunas $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1⁺, el predominio corresponde a las $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1⁻, como ya habían apuntando Wong y colaboradores (*Wong y cols., 2014*). A 7PN, esta población desaparece y junto con las células $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi}, que continúan siendo minoritarias, hay otras poblaciones intermedias, como $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{med}, $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1^{hi} y $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{med}. Con ligeras diferencias, debido a que nuestro estudio se llevó a cabo a 7PN y el suyo a 3PN y en timos adultos, estos valores son similares a los descritos originalmente por Wong y colaboradores (*Wong y cols., 2014*).

En los mutantes, como en los WT, la población $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi} a 17.5F es escasa, pero el porcentaje de tales células en timos EphB2^{-/-} es significativamente más alta que en los controles; por el contrario, la población mayoritaria $\alpha 6^{\text{med}}$ Sca-1⁻ era más baja en los tres mutantes, sugiriendo ambos resultados un cierto retraso en la diferenciación de las poblaciones mutantes. A 7PN, sin embargo, no hay diferencias significativas entre WT y mutantes en la población $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi}, salvo en los timos EphB2LacZ que tienen valores más altos.

La última población de progenitores epiteliales estudiada expresa el marcador podoplanina (PDPN), una proteína integral de membrana tipo II (*Farr y cols., 1992*). Onder y colaboradores (*Onder y cols., 2015*) han descrito recientemente una población en el BCM, donde tradicionalmente se ha considerado residían los precursores del epitelio tímico adulto (*Anderson y Jenkinson, 2015*), CCL19⁺PDPN⁺ capaz de generar directamente mTEC.

Esta población, sin embargo, al menos en nuestro estudio, no se muestra tan homogénea y desgraciadamente no se ha podido realizar el estudio semicuantitativo previsto sobre secciones tímicas postnatales por la desorganización de las médulas mutantes, que hacen imposible localizar las áreas córtico-medulares y determinar con fiabilidad la presencia en ellas de las células PDPN⁺. Nuestras conclusiones son, consiguientemente provisionales y requieren confirmación. En los timos WT de 7PN, la expresión de PDPN ocurre en el área medular K5⁺, como había descrito Farr y colaboradores (*Farr y cols., 1992*). Dicha expresión no es homogénea, distinguiéndose una población mayoritaria Ly51^{-/-}K5⁺PDPN⁺ en la parte más interna de la médula y células Ly51^{-/-}K5⁺PDPN^{-/-} y Ly51^{-/-}K5⁺PDPN^{hi} más próximas al límite córtico-medular. Dentro de esta zona córtico-medular, que co-expresa Ly51 y K5, hay algunas células Ly51⁺K5⁺PDPN⁺ aisladas en el lado medular, aunque también Ly51⁺K5^{-/-}PDPN⁺. Las primeras, que expresan los tres marcadores, podrían ser los progenitores descritos. En los mutantes EphB2^{-/-}, la población medular Ly51^{-/-}K5⁺PDPN^{hi} parece reducida y en los timos EphB3^{-/-} algunas de estas células parecen sustituidas por células Ly51^{-/-}K5⁻PDPN⁺. También en las médulas EphB2^{-/-} y EphB3^{-/-}, pero no en las EphB2LacZ, parece haber una menor proporción de células Ly51^{-/-}K5⁺PDPN⁺ y en el borde córtico-medular EphB2^{-/-} podría haber más células Ly51⁺K5^{-/-}PDPN⁺.

La falta de señalización mediada a través de EphB2 o EphB3 es responsable de las alteraciones fenotípicas observadas en los timos deficientes en EphB

Como ya hemos discutido antes, para demostrar que realmente todos los cambios observados en el comportamiento de las TECs se debían a la falta de señalización mediada por EphB2 o EphB3, analizamos el efecto del bloqueo de las interacciones Eph/ephrinas-B en FTOCs WT de 13.5F con proteínas de fusión solubles EphB2-Fc o ephrina-B1Fc sobre la maduración de las poblaciones epiteliales confirmando el descenso de la celularidad, la acumulación de las proporciones de las células MTS20⁺ y la reducción de las de las células MTS20⁻ y, con todo ello, el retraso observado en el estudio citométrico de la diferenciación epitelial.

Un paso más para evaluar los orígenes de este retraso de la maduración epitelial tímica era identificar la población o poblaciones epiteliales implicadas directamente en él y, al mismo tiempo, tratar de determinar la relevancia de cada señal transmitida por el par

EphB2/B3-ephrinas-B. El protocolo para llevar adelante estos estudios lo habíamos utilizado hace algunos años para determinar si el fenotipo epitelial de timos EphB2 y/o EphB3 KO eran dependientes exclusivamente del propio epitelio o también influía en el componente linfóide del órgano (*García-Ceca y cols., 2009b*); en nuestro estudio, FTOCs alinfoides WT o mutantes se trasplantaron bajo la cápsula renal de ratones WT o mutantes analizándose 3 semanas después, la celularidad y la diferenciación de las poblaciones MTS20, Ly51 y UEA1.

Los resultados obtenidos a partir de esta aproximación experimental ponen de manifiesto lo ya descrito por nosotros y otros autores repetidas veces (*Wilkinson, 2003; Pasquale, 2008; Alfaro y cols., 2011*) acerca de que los fenotipos dependientes de la señalización Eph/ephrinas son el resultado del balance global de señales y cualquier cambio en él da lugar a nuevos fenotipos, pudiéndose alcanzar, no obstante, algunas conclusiones interesantes:

1) La conclusión general de estos resultados, que contesta a la pregunta que antes formulábamos, es que, efectivamente, los fenotipos observados en los ratones deficientes en EphB se deben a la falta de su señalización puesto que con esta nueva aproximación experimental se repiten aquellos u otros muy parecidos.

2) La primera conclusión que se obtiene de este planteamiento experimental es que, tanto en combinaciones donde estromas mutantes y progenitores linfoides WT (E: EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}; PL: WT) o estromas WT y progenitores linfoides mutantes (E: WT; PL: EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}) se juntan se produce un descenso del tamaño de los lóbulos y de su celularidad. Estos resultados indican, por tanto, que la celularidad disminuye significativamente en los lóbulos aislados de la cápsula renal si ellos o los progenitores que los colonizan derivan de ratones EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}, indistintamente, e independientemente de que las células mutantes correspondieran al estroma o a los progenitores linfoides (**ver Fig. 163**). En cualquiera de estas condiciones, por otro lado, las EphB y sus ligandos transmitían una sola señal: en los timocitos (F o R), y otra complementaria en el estroma (R o F) (**Fig. 204**).

3) Resultados en los que se comparaba el tamaño/rendimiento celular de lóbulos EphB2^{-/-} y EphB2LacZ colonizados por progenitores WT y viceversa demuestran que, a diferencia de lo indicado en el punto anterior en que se comparaban lóbulos y progenitores EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} vs WT, la recuperación de la señal

reverse en TEC o progenitores tenía consecuencias distintas. Si la recuperación de la señal *reverse* mediada por EphB2 se realizaba en TEC (E: WT; PL: EphB2LacZ) se recuperaba la celularidad WT (**ver Fig. 165A**). En esta condición, las TEC recibían señales mediadas por EphB2 tanto F como R (**Fig. 204F**). Si, por el contrario, la recuperación de la señalización *reverse* se producía en los progenitores (E: EphB2LacZ; PL: WT), no se recuperaba la celularidad (**ver Fig. 166A**). En este caso, las TEC recibían señales R pero no F (**Fig. 204G**) sugiriendo, por tanto, que más que la recuperación de la señal *reverse* lo que el epitelio necesitaba eran ambas señales (F y R) mediadas por EphB2 para recuperar la celularidad tímica, independientemente de las señales que reciben los progenitores linfoides.

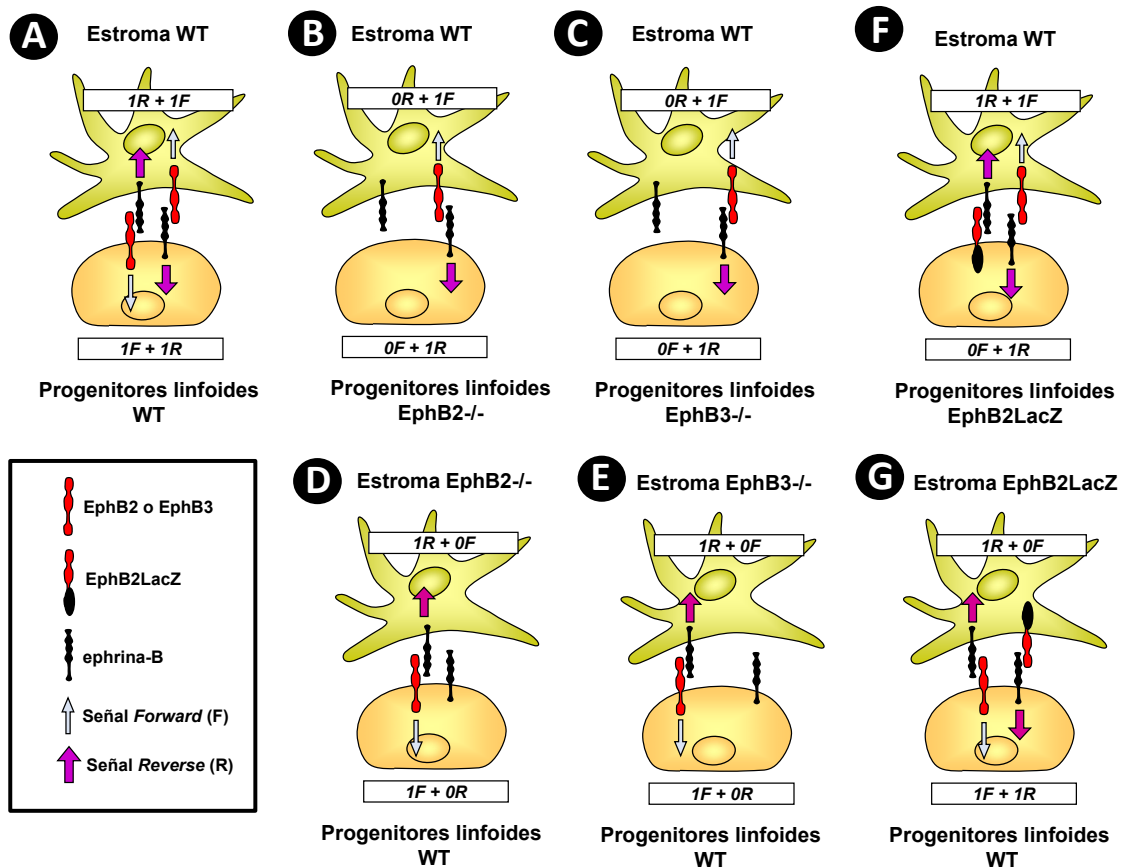


Figura 204. Señales transmitidas por EphB y ephrina-B en estudio en los diferentes tipos de combinaciones. Los diagramas muestran la señalización EphB/ephrina-B entre las células epiteliales y linfoides. Para ello, se han representado sobre las células las moléculas que expresan: EphB2 o EphB3 o EphB2LacZ y ephrina-B, así como las señales que derivarían de la interacción entre estas moléculas, indicando como: F: señal *forward*, R: señal *reverse*. Nótese como en la condición en la que los progenitores linfoides EphB2LacZ colonizan el estroma WT (F), este último recibe todas las señales WT (F+R); mientras que cuando los progenitores linfoides son WT y colonizan el estroma EphB2LacZ (G), son los progenitores los que reciben todas las señales (F+R). En el resto de combinaciones, siempre falta una de las señales en ambas células (B, C, D y E).

Notablemente, en este mismo modelo donde se comparan EphB2^{-/-} y EphB2LacZ y la señalización es obviamente la descrita, los efectos sobre la diferenciación epitelial son distintos de los observados sobre la celularidad. La recuperación de una señal *reverse* inducida por EphB2 en el epitelio, que expresa entonces las dos señales F y R mediadas por EphB2 (**Fig. 204F**), cursa con una caída de las proporciones de células MTS20⁺ y de cTEC y un aumento de las mTEC (**ver Fig. 165**), sugiriendo que las dos señales mediadas por EphB2 en las TEC favorece la formación de epitelio medular. Por el contrario, la ausencia de la señal *reverse* en TEC, aunque se mantenga en los progenitores linfoides (**Fig. 204B**), aumenta la proporción de células MTS20⁺, disminuye la de cTEC y no muestran diferencias en las de mTEC (**ver Fig. 165**), lo que sugiere que la señal *reverse* de EphB2 debe ser menos importante que la *forward* para el control de la diferenciación del epitelio medular, aunque no irrelevante, porque cuando en las TECs hay señales F y R el efecto es mayor que cuando sólo hay señales F.

4) Estos resultados indican que la presencia de ambas moléculas (EphB2 y EphB3) parece necesaria para un desarrollo normal del órgano, sin embargo, la ausencia de cada una de ellas produce fenotipos diferentes. O sea, no se trata sólo de recibir (o no) las adecuadas señales F y R, si no que es fundamental la molécula que transmite las señales, EphB2 o EphB3. Esto es lo que dicen los experimentos en los que las quimeras se establecen entre mutantes (**Fig. 205**). Mientras lóbulos EphB3^{-/-}, que reciben señales R de EphB3 y F de EphB2, colonizados por progenitores EphB2^{-/-}, que reciben señales F de EphB3 y R de EphB2 (E: EphB3^{-/-}; PL: EphB2^{-/-}), muestran celularidad normal (**ver Fig. 167A**); en la condición contraria, los lóbulos EphB2^{-/-}, que reciben señal R de EphB2 y F de EphB3, colonizados por progenitores EphB3^{-/-} (E: EphB2^{-/-}; PL: EphB3^{-/-}), muestran hipocelularidad (**ver Fig. 167A**) apuntando que probablemente las señales F EphB2 son más importantes que las mediadas por EphB3 para la celularidad tímica como también demuestran otros resultados de este trabajo.

5) Como acabamos de ver al analizar la celularidad y la diferenciación epitelial en las quimeras establecidas con EphB2^{-/-} y EphB2LacZ aparentemente estos dos parámetros están regulados de manera diferente por las EphB. Curiosamente, cuando se comparan quimeras establecidas entre estromas y células linfoides mutantes, aunque las señales son distintas las diferencias no son grandes. Estromas EphB3^{-/-} y

progenitores EphB2^{-/-} tienen celularidad normal, pero en la condición contraria (E: EphB2^{-/-}; PL: EphB3^{-/-}) hay hipocelularidad. Como decíamos, en la primera condición, EphB2 transmite señal F a las TEC y R a los progenitores linfoides y EphB3 R a TEC y F a los progenitores; en la segunda, las TEC reciben señales F EphB3 y R EphB2, y los progenitores lo contrario, F de EphB2 y R de EphB3. Si, como hemos visto en las quimeras EphB2^{-/-} y EphB2LacZ, la celularidad sólo se recupera cuando la señal R de EphB2 se recupera en TEC, donde ya hay una señal F de EphB2, pero no cuando lo hace en los progenitores linfoides, tendríamos que pensar que en la combinación E: EphB3^{-/-}; PL: EphB2^{-/-}, en la que también se recupera la celularidad, la señalización F de EphB2 en TEC es esencial, junto con una R, sea EphB2 o EphB3. La mayor importancia de EphB2 para el control de la celularidad tímica se confirma analizando las quimeras E: EphB2^{-/-}; PL: EphB3^{-/-}, en las cuales aunque en las TECs haya una señal R EphB2 la celularidad no llega a los valores control, porque, a diferencia de EphB2, una señal F EphB3 no es suficiente para alcanzarlos.

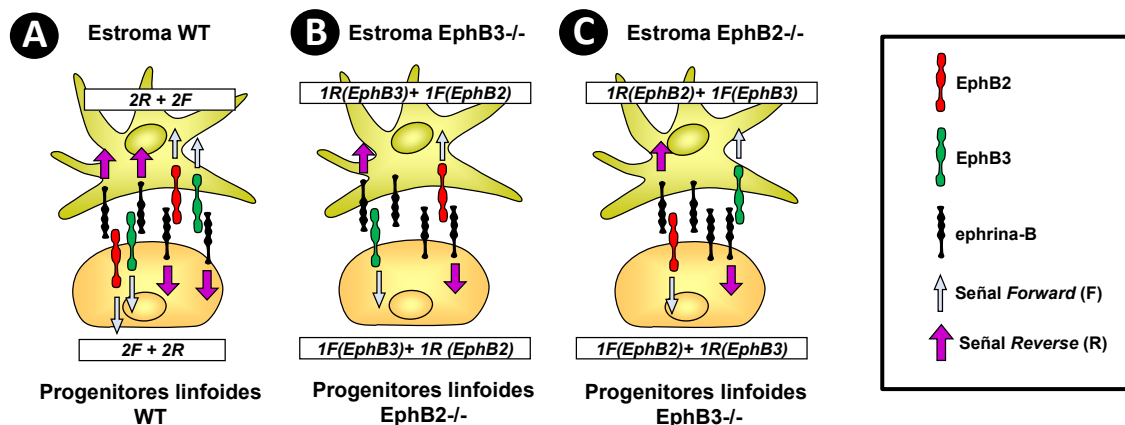


Figura 205. Señales transmitidas por EphB y ephrina-B en quimeras establecidas con estromas o progenitores linfoides mutantes. Los diagramas muestran la señalización EphB/ephрина-B entre las células epiteliales y linfoides. Se representan sobre las células las moléculas que expresan: EphB2 y/o EphB3 y ephrina-B, así como las señales que derivarían de la interacción entre ellas, indicando como: F: señal *forward*, R: señal *reverse*. Nótese como en ambas combinaciones (B y C) las señales F o R que reciben son las mismas pero transmitidas a través de moléculas diferentes. Ambas, al comparar con la combinación WT (A), pierden una señal F y una R.

Por el contrario, todas las combinaciones analizadas utilizando conjuntamente estroma y células linfoides mutantes generaban el mismo fenotipo epitelial, con caídas significativas de las proporciones de células MTS20⁺ (ver Fig. 167B) y cTEC (ver Fig. 167D) y subidas en la población epitelial medular, Ly51⁻UEA1⁺ (ver Fig. 167E). Estos resultados sugieren que cualquier señal F presente en las TECs, mediada por EphB2 o

EphB3, junto con cualquier señal R dirigen la diferenciación epitelial hacia epitelio medular, ocasionando caída del porcentaje de las células inmaduras MTS20⁺ y de las corticales Ly51⁺UEA1⁻ y aumentando la de las Ly51⁺UEA1⁺. Por otra parte, el fenotipo resultante de las quimeras establecidas con E: WT; PL: EphB2LacZ es muy parecido pero con un porcentaje aún mayor de mTEC (**ver Fig. 165**). En estas quimeras, las TEC tienen una señal F y una R mediadas ambas por EphB2 (**Fig. 204F**), confirmando que las dos EphB son necesarias para la maduración epitelial tímica, pero EphB2 parece más relevante para la generación de mTEC, como apuntaban los resultados de citometría de flujo.

6) Nuestros resultados hasta ahora apuntaban que la señalización mediada por EphB2 está más implicada en el control de la celularidad tímica que la de EphB3 y que dicha señalización favorece la diferenciación de mTEC. Sin embargo, cuando estudiamos quimeras formadas por las distintas combinaciones de estroma y progenitores EphB2^{-/-}, EphB3^{-/-} y WT, los resultados no son tan claros sugiriendo que la explicación del funcionamiento de EphB2 y EphB3 en la maduración del epitelio tímico es más compleja. Para analizar este hecho, consideramos la señalización mediada por EphB2 y por EphB3, no por separado, si no de manera conjunta.

Si se comparan las quimeras formadas por progenitores linfoides WT con E: EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-}, o la combinación contraria, progenitores mutantes y estromas WT, en cualquiera de ellas hay un aumento de MTS20⁺, más importante cuando los progenitores son EphB2^{-/-}, lo que puede significar un retraso en su maduración, pero también que este tipo de aproximación experimental conduce a una acumulación de células epiteliales inmaduras, que habíamos identificado previamente como células K5⁺K8⁺, incluso cuando lóbulos WT son injertados en ratones WT (*García-Ceca y cols., 2009b*).

Nuestros resultados utilizando ratones KO muestran que cuando falta la señal F EphB3 tanto en TEC como en progenitores linfoides hay deficiencias particularmente severas en el epitelio cortical, mayores que cuando falta EphB2, cuya ausencia parece afectar más al epitelio medular. En conjunto, todos estos resultados nos sugieren que ambas moléculas son necesarias para la maduración de los dos componentes epiteliales tímicos y que la mayor o menor importancia de cada una depende probablemente del balance de las restantes señales establecidas.

¿Qué nos dicen a este respecto los resultados obtenidos con las quimeras? En el análisis realizado, la presencia de señales EphB2 (F transmitida en progenitores linfoides más R inducidas en TECs (E: WT; PL: EphB3^{-/-}) o viceversa (E:EphB3^{-/-}; PL:WT)) (**ver Fig. 168D, 169D**) resulta en un porcentaje de células medulares Ly51⁻ UEA1⁺ igual o mayor que los valores control. Por el contrario, aún en presencia de señales F y R mediadas por EphB3, la proporción de células corticales Ly51⁺UEA1⁻ disminuían en cualquiera de las condiciones estudiadas (E: EphB2^{-/-}; PL: WT, **ver Fig 169C** o E: WT; PL: EphB2^{-/-}, **ver Fig. 168C**). En nuestros resultados, sólo la combinación E: EphB2LacZ; PL: WT (**ver Fig. 166D**) generaba valores similares a los controles de células Ly51⁺UEA1⁻. En esta combinación, el estroma recibía señales F y R mediadas por EphB3, pero en el caso de los progenitores, éstos recibían todas las señales mediadas por EphB2 y EphB3.

Hay que considerar también que los modelos experimentales de los que hablamos son muy diferentes, y que en las quimeras la maduración epitelial no es ni mucho menos igual que durante la ontogenia tímica y no sabemos como es el grado de colonización linfóide de los lóbulos mutantes trasplantados que, como hemos demostrado, atraen menos células linfoides que los WT (*Kendall y cols., 1988; Martin-Fontecha y cols., 1992*).

Una vez demostrado que, efectivamente, los lóbulos tímicos de 13.5F deficientes en EphB se comportaban, en términos generales como habíamos observado directamente en los lóbulos aislados frescos y que, por tanto, podíamos asegurar que es la falta de señalización mediada por EphB2 o EphB3 lo que ocasiona los fenotipos encontrados y, más concretamente, la hipocelularidad y el retraso en la maduración epitelial, lo lógico era identificar la población o poblaciones primitivas en las que podía iniciarse el proceso. Se trataba, en esencia, de intentar identificar entre las poblaciones más inmaduras si alguna es particularmente sensible a la falta de las EphB. A tal fin se han desarrollado protocolos similares a los publicados por otros autores, incluso se ha trabajado directamente en sus laboratorios, se han probado distintas poblaciones purificadas y protocolos para conseguir la máxima interacción entre las TEC aisladas (Matrigel, Fibroblastos murinos embrionarios (MEF) en presencia o no de timocitos, etc...) pero los resultados han sido mínimos. En nuestra opinión es un problema de la

cantidad de células epiteliales de las que partimos, pero las disponibilidades del animalario de la UCM no nos permiten estabular más ratones para poder hacer *pools* mayores con los que obtener un número suficiente de células. Esta parte del proyecto se ha abandonado pero creemos importante y honesto señalar lo relevante de esta aproximación y reconocer, en cualquier caso, nuestro fracaso.

Origen de los cambios observados en los timos deficientes en EphB que conducen a sus fenotipos característicos

Hasta ahora hemos analizado posibles causas responsables de los fenotipos observados en los timos deficientes, como el menor índice de colonización de los progenitores fetales, el incremento de la muerte tanto en la población linfóide como en las TEC, el menor índice proliferativo y el retraso en la maduración de los progenitores linfoides y epiteliales. Hemos apuntado también que todos estos procesos están relacionados entre sí y sus efectos son cumulativos incrementando las alteraciones desde los primeros estadios del desarrollo hasta el timo adulto. Revisaremos ahora el posible origen de estos agentes responsables de los cambios y el papel que en ellos tienen las interacciones T-TEC mediadas por Eph/ephrinas-B.

Papel de las interacciones timocitos-TEC en el fenotipo de los timos deficientes en EphB

Numerosos estudios han considerado que el *crosstalk* T-TEC es esencial para la maduración de los timocitos y del epitelio tímico (Klug y cols., 2002; Rossi y cols., 2007c; Shakib y cols., 2009) considerándose que desde el momento de la llegada de los progenitores linfoides, ellos y el epitelio maduran juntos (van Ewijk y cols., 2000); en ratas, la proliferación epitelial aumenta tras la llegada de ellos (Brelinska y cols., 2001) y la aparición de la región medular está asociada en el timo adulto a la aparición de timocitos SP (Gray y cols., 2006) y a la de células T V γ 5⁺ y LTi en el fetal (Roberts y cols., 2012). Consiguientemente un posible origen de los fenotipos encontrados en los timos mutantes podría estar relacionado con defectos en dichas interacciones. De hecho, previamente ya habíamos postulado defectos en tales interacciones en quimeras

establecidas *in vivo* en ratones SCID con progenitores deficientes en EphB2 y/o EphB3 (Alfaro y cols., 2011).

La llegada de los timocitos convierte la lámina epitelial bidimensional basal en una red tridimensional esencial para la evolución del tejido tímico. Cualquier alteración en la colonización linfóide o el bloqueo de su diferenciación resulta en la desorganización de la red tridimensional y la aparición de quistes epiteliales donde el epitelio revierte a la condición bidimensional (van Ewijk y cols., 2000). Este proceso puede prevenirse suministrando células linfoides. Así, timos SCID, que contienen progenitores linfoides tempranos, organizan una corteza tímica pero no una médula, lo que puede conseguirse si se añaden timocitos maduros CD4⁺ o CD8⁺ (Shores y cols., 1991; van Ewijk y cols., 1994).

De forma curiosa, recientemente demostrábamos una condición semejante en ratones con defectos en ephrina-B1 y/o -B2 condicionados a timocitos o TEC (Cejalvo y cols., 2015) indicando que las interacciones Eph/ephrinas-B pueden afectar la maduración de timocitos y TEC alterando sus mecanismos de *crosstalk*. En realidad, en muchas otras condiciones *in vivo* e *in vitro*, algunas mencionadas ya en esta discusión, han demostrado la dependencia de las interrelaciones timocitos-epitelio tímico de las Eph y ephrinas:

- El bloqueo de la maduración de timocitos DP observado en ratones EphA4^{-/-} correlaciona con el colapso del epitelio cortical (Munoz y cols., 2006).
- La colonización de lóbulos alinfoides deficientes en EphB por células linfoides WT induce diferenciación epitelial, aunque no exactamente igual a la observada en los timos EphB KO, indicando que el proceso está gobernado autónomamente por el epitelio, pero los timocitos ejercen cierto papel no autónomo (García-Ceca y cols., 2009b).
- RTOCs formados con TEC fetales y timocitos DP en presencia de proteínas bloqueantes ephrina-B1Fc desorganizan la red epitelial, previenen las interacciones timocitos-TEC y alteran la señalización mediada por el TcR (Alfaro y cols., 2007).
- El número y momento de formación de conjugados timocitos-TEC se altera cuando se utilizan células DP deficientes en EphB (Alfaro y cols., 2011).

- La migración *in vitro* de timocitos por el estroma tímico puede regularse inhibiendo la señal mediada por EphB2 o modulando negativamente sus interacciones con ephrinas-B (*Stimamiglio y cols., 2010*).

En el presente trabajo, tanto lóbulos tímicos WT como deficientes en EphB cultivados 5 días en ausencia de timocitos (tratados con 2'-dGuo) muestran mayores porcentajes de células MTS20⁺ y menores de MTS20⁻ en comparación a los cultivos mantenidos con timocitos, en ausencia de 2'-dGuo. Anteriormente, ya hemos discutido la relación entre el número de células linfoides colonizadoras del primordio tímico de 12.5F y la proporción de células inmaduras MTS20⁺ y, en esa misma línea, como el bloqueo de las interacciones Eph/ephrinas-B en FTOC bloquean la diferenciación de esa población epitelial. En esos experimentos, los lóbulos alinfoides tratados o no con proteínas de fusión también acumulaban células inmaduras MTS20⁺, algo descrito anteriormente por otros autores (*Rossi y cols., 2007c*).

En el caso de los lóbulos mutantes, cultivados con o sin timocitos, solamente había diferencias entre ellos cuando los cultivos contenían timocitos; entonces los lóbulos EphB2^{-/-} tenían mayores porcentajes de MTS20⁺ y menores de MTS20⁻ que los FTOCs establecidas con las otras células mutantes. Estas diferencias desaparecen en los cultivos tratados con 2'-dGuo. Es obvio que en los FTOCs WT sin timocitos la señalización Eph/ephrina-B sólo desaparece entre timocitos y TECs, mientras en los FTOCs mutantes, tampoco la hay entre TEC y TEC. Para confirmar este extremo, tratamos lóbulos WT 13.5F alinfoides con proteínas de fusión. Aquí, tras desaparecer los timocitos las proteínas bloquean las interacciones homotípicas TEC-TEC. En estos lóbulos hay un aumento de la proporción de células MTS20⁺ y un descenso de las MTS20⁻ confirmando la relevancia de la señalización Eph/ephrina establecida entre las propias TEC, algo que también habíamos descrito anteriormente en relación con la supervivencia del epitelio tímico mutante (*García-Ceca y cols., 2013*).

Es abrumadora por tanto, la evidencia que apoya que muchas de las alteraciones descritas en los timos deficientes en EphB pueden deberse en origen al papel que Eph y ephrinas-B juegan en las interacciones timocitos-TEC consideradas esenciales para la biología del timo.

Lo que los complejos nurse nos enseñan acerca del papel de Eph/ephrinas-B en las interacciones timocitos-TEC

Las denominadas células *nurse* constituyen un excelente modelo experimental para el estudio *in vitro* de las interacciones timocitos-TEC (Hendrix y cols., 2010), que utilizamos aquí para evaluar si su formación y organización se altera en los timos deficientes en EphB, confirmándonos, una vez más, la relevancia de las interacciones timocitos-TEC mediadas por estas moléculas para la aparición de los fenotipos observados. No hay, hasta nuestro conocimiento, ningún estudio similar sobre células *nurse* y Eph/ephrinas.

En general, la caracterización de las células *nurse* confirma su fenotipo cortical anteriormente descrito (Hendrix y cols., 2010; Chilukuri y cols., 2014). Nuestros resultados demuestran que estas células expresan Ly51, CD205, CD40 y MHCII, pero no MTS20 o marcadores medulares, como K5. Otros autores han demostrado que el 10% de las TEC $\beta 5t^+$ son células *nurse* en timo adulto (Nakagawa y cols., 2012). Por otro lado, dada la participación de Eph y ephrinas en los procesos de atracción/repulsión y adhesión celular no es de extrañar que, tanto las células epiteliales como los timocitos que forman los complejos linfo-estromales expresen EphB2 y EphB3 y sus ligandos, ephrina-B1 y ephrina-B2, condición necesaria para poder adscribir a estas moléculas los cambios que pudieran generar en las células *nurse* su falta.

Sobre esta base, nuestros resultados demuestran que los timos deficientes en EphB2 o en EphB3 generan menos células *nurse* que los WT, mientras los EphB2LacZ forman significativamente más, sugiriendo la importancia de las señales *reverse* en su formación. Aunque los modelos no son exactamente iguales, utilizando conjugados establecidos con TECs y timocitos DP obtuvimos resultados similares. El número de aquellos establecidos con timocitos EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} era menor que los formados con células WT, mientras que los que usaban EphB2LacZ generaban más conjugados (Alfaro y cols., 2011). Por otro lado, es conocido que las células *nurse* albergan un número muy variable de timocitos, entre 7 y 50 (Hendrix y cols., 2010). En nuestras manos, el 50% de los complejos obtenidos de timos WT contienen 6-10 timocitos, mientras en aquellos derivados de los mutantes la proporción de estos complejos mayoritarios con 6-10 timocitos se reduce significativamente, al tiempo que aumentan

los que tienen más o menos timocitos aunque sin llegar a mostrar diferencias significativas.

Un vez más estos experimentos demuestran la relevancia de las Eph/ephrinas-B en las interacciones timocitos-TEC que *in vivo* e *in vitro* son esenciales para la maduración funcional de ambos componentes tímicos

Relevancia de la expresión de Eph y ephrinas-B en los primordios tímicos tempranos

Aunque ya habíamos publicado previamente la expresión de las EphB2 y EphB3 y las ephrinas-B1 y -B2 en timo adulto y fetal (Alfaro y cols., 2008), necesitábamos un análisis más exhaustivo a fin de que, si ello fuera posible, identificar poblaciones celulares tímicas donde algunas de estas moléculas se expresaran de manera particularmente relevante o, todo lo contrario, no lo hicieran y, así, intentar correlacionar esa particular expresión con los cambios fenotípicos de los timos mutantes. Nuestros resultados confirman, en primer lugar, que todas esas Eph y ephrinas-B se expresan en todas las poblaciones linfoides y epiteliales en todos los estadios estudiados, de manera que tanto timocitos como TEC expresan las moléculas y podrían estar recibiendo tanto señales *forward* como *reverse*. Sin embargo, hay diferencias cuantitativas muy importantes, aunque es difícil correlacionarlas con los cambios observados en el componente linfoide o epitelial de los timos mutantes porque no sabemos cuantas moléculas hacen falta para que se activen (o inhiban) estas vías de señalización ni cuantas células deben expresarlas para que su falta afecte sustantivamente al órgano. No obstante, podemos apuntar algunas especulaciones generales que como tales han de considerarse y que discutimos a continuación.

El porcentaje de células que expresan Eph y ephrinas-B es mucho menor entre los timocitos que en las TECs, y también entre ellas hay diferencias destacables. Esta diferente expresión podría explicar porque los efectos de la falta de EphB2 o EphB3 son mucho más evidentes en las TECs que en los timocitos. La mayor expresión corresponde a la EphB2 y, aún así, sólo se expresa aproximadamente en un 20% de los timocitos, mientras la de EphB3 sólo lo hace en un 10%, sin que estos perfiles cambien a lo largo del estudio realizado entre 12.5F y 15.5F. La expresión de ephrina-B1 y -B2 es

aún menor y gradualmente va disminuyendo con caídas significativas a partir de 13.5F en el caso de la ephrina-B1 y de 14.5F en el de ephrina-B2.

Por otro lado, aunque en el estudio no se han identificado las poblaciones linfoides que expresan Eph/ephrinas-B entre 12.5F y 15.5F han de corresponder a timocitos DN y, más concretamente, a células DN1 y DN2 hasta 13.5F y a DN3 y DN4 a 14.5F y 15.5F. No hay ningún dato similar en la literatura; solamente Shimoyama y colaboradores (*Shimoyama y cols., 2002*) describieron que proteínas de fusión ephrina-B1Fc interaccionaban con DN fetales y Coles y colaboradores (*Coles y cols., 2004*) indicaron que el 65% de los DN de timos fetales expresaban EphB2.

Si relacionamos estos datos con los cambios fenotípicos observados en las poblaciones linfoides de los timos deficientes en estos primeros estadios podemos alcanzar algunas conclusiones, aunque hay que tomarlas con cautela. Varios de los parámetros linfoides estudiados en nuestro trabajo: proporción y número de células EpCAM⁺CD45⁻, colonización de progenitores y retraso en la maduración DN muestran mayor severidad en los timos deficientes en EphB2 que en los otros estudiados, lo que podría reflejar que EphB2 se expresa el doble que EphB3 en las células linfoides y su ausencia podría, por tanto, tener efectos más drásticos. En el caso de la colonización linfoide, ya habíamos visto en timos adultos que la menor colonización de timos EphB2^{-/-} correlaciona con una reducción de la expresión de ephrina-B1 y -B2 en los endotelios tímicos, mientras en los EphB3^{-/-} la caída sólo afecta a la ephrina-B1 (*Alfaro y cols., 2015*).

En el caso del epitelio, la máxima expresión de todas las moléculas ocurre a 12.5F y es, aproximadamente igual para EphB2, EphB3 y ephrina-B2 (70% de células positivas para EphB2 y ephrina-B2). Los valores de la ephrina-B1 son mucho más bajos (20-40% de células epiteliales totales positivas) y apenas varían entre 12.5F y 15.5F.

A la hora de correlacionar estos resultados con los obtenidos en nuestros estudios fenotípicos recordemos que a 12.5F las poblaciones predominantes son las MTS20⁺ y Ly51⁻UEA1⁻, empezando la up-regulación de Ly51 y ligeramente de UEA1 a 13.5F; a 14.5F hay poblaciones corticales Ly51⁺UEA1⁻, que continúan regulando positivamente la expresión de Ly51 y también empieza en este estadio la del marcador medular UEA1. En relación con la expresión de Eph/ephrinas-B, el porcentaje de células de cualquier fenotipo que expresaba EphB2, EphB3 o, al menos, ephrina-B2 es más alto al

principio del desarrollo, sobre todo a 12.5F, y, en general, la expresión de EphB2 es ligeramente mayor que la de EphB3. El patrón de evolución de la expresión de Eph/ephrinas-B de las células Ly51⁻UEA1⁻ es prácticamente igual al de la población epitelial total, con una fuerte expresión al principio, seguida de caída. EphB2 y EphB3 se expresan en un porcentaje algo menor en células Ly51⁺UEA1⁻, pero más células expresan ephrina-B1. Las poblaciones Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁻UEA1⁺ tienen patrones similares con un alto porcentaje de células positivas para las cuatro moléculas a 12.5F y 13.5F, y luego una brusca caída.

No obstante, si queremos relacionar estos datos con los fenotipos epiteliales observados en los timos mutantes a lo largo del desarrollo debemos considerar que en los estadios analizados el porcentaje de células Ly51⁻UEA1⁻ y Ly51⁺UEA1⁻ es particularmente alto, mientras los valores de Ly51⁺UEA1⁺ y Ly51⁻UEA1⁺ respecto al epitelio total son mínimos. Analizando desde estas consideraciones la expresión de Eph y ephrinas-B, sólo hay un porcentaje importante de células que expresan Eph y/o ephrinas-B en las poblaciones Ly51⁻UEA1⁻ y Ly51⁺UEA1⁻, mayores en la primera, que vuelve a repetir el perfil de evolución de la población epitelial total, con valores altos para EphB2 y EphB3, y menores para las ephrinas, sobre todo, ephrina-B1 a 12.5F, cayendo después hasta porcentajes mínimos a 14.5F y 15.5F para las cuatro moléculas. Los únicos datos sobre la expresión de Eph/ephrinas-B durante el desarrollo tímico han sido publicados por nosotros (*Cejalvo, 2011*), pero se utilizó una aproximación experimental muy distinta a la aquí mostrada. En primer lugar, se aislaron dos poblaciones, EpCAM⁺CD45⁻Ly51⁻, considerada medular, y EpCAM⁺CD45⁻Ly51⁺, correspondiente a cTEC, de FTOCs de 15F tras permanecer en cultivo 5 días. Estas muestras correspondían a lo que podrían considerarse, por tanto, poblaciones tímicas postnatales. Su análisis por qPCR determinó una mayor expresión de las EphB1, EphB2, EphB3 y ephrina-B3 en mTECs, y de EphB4, EphB6, ephrina-B1 y ephrina-B2 en cTECs. El análisis también por qPCR de las células epiteliales totales EpCAM⁺CD45⁻ a 12, 14 y 16 días demostró que a lo largo del desarrollo, en coincidencia con nuestros resultados, la expresión de EphB1, EphB2 y EphB3 disminuían de 12F a 16F; la expresión de las otras dos EphB no estudiadas aquí, aumentaba en el caso de EphB4 y se mantenía igual en el de EphB6. Respecto de las ephrinas, la expresión de ephrina-B1, como en nuestro caso, no variaba sustancialmente, mientras la de ephrina-B2

aumentaba gradualmente incluso a 16F, como nosotros observamos hasta 14.5F, pero en nuestro caso, luego disminuía, igual que la expresión de ephrina-B3 que se reduce gradualmente. Esta diferencia en el comportamiento de la ephrina-B2 podría deberse a los diferentes métodos de evaluación seguidos.

En conjunto, estamos en los estadios del desarrollo tímico en los que se están produciendo las primeras interacciones entre el primordio epitelial y los progenitores linfoides que lo colonizan y, después, entre las distintas subpoblaciones DN y las células Ly51⁺ que constituyen la corteza en expansión. En ellos, la falta de Eph y ephrinas-B, particularmente, la de EphB2, EphB3 y ephrina-B2, afectaría las primeras etapas del desarrollo epitelial, básicamente a las poblaciones Ly51⁻UEA1⁻ y Ly51⁺UEA1⁻, predominantes a 12.5F y 13.5F, e indirectamente, las alteraciones sufridas por esas poblaciones afectarían después a otras de estadios posteriores.

Los cambios celulares que ocurren en el epitelio podrían modular las interacciones timocitos/TEC

En relación con el epitelio, una de las primeras cosas que llama la atención al observar a microscopía de luz, microscopía electrónica o inmunohistoquímica, una sección de los timos mutantes es la profunda alteración sufrida por la morfología de las células epiteliales o incluso, en algunas zonas, la falta de tales células que aparecen a microscopía electrónica degeneradas, dejando amplias zonas tímicas en las que parece que los timocitos estuvieran “flotando” en un masa de restos de células epiteliales totalmente aislados de las TECs más próximas, lo cual, evidentemente, impide las interacciones entre ellas y con los timocitos (*García-Ceca y cols., 2009a*).

Intentamos, entonces, confirmar estos resultados cuantificando los cambios sufridos en la morfología de las TECs mutantes para lo que, ante la imposibilidad de seguir *in situ* los procesos celulares de las células epiteliales en las secciones histológicas tímicas, utilizamos RTOCs establecidos a partir de TECs WT, EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} de 14.5F o derivadas de lóbulos tímicos WT 14.5F tratados con los anticuerpos inhibitorios anti-EphB2 o anti-EphB3.

Antes de analizar la morfología epitelial y la organización histológica de todos estos lóbulos confirmamos que los anticuerpos utilizados realmente bloqueaban la señalización *forward* mediada por EphB2 o por EphB3 y, por tanto, los hacía, en gran

medida, similares a los timos estudiados en los ratones deficientes en EphB2 o EphB3, algo que indirectamente ya confirmaba el hecho de que la morfología de las TECs de los lóbulos tratados (**ver Fig. 192**) y de los timos adultos mutantes eran realmente parecidas. Para ello, comparamos por *Western Blot* los niveles de tirosinas fosforiladas totales y específicas del dominio citoplásmico de EphB3 o EphB2 en suspensiones tímicas totales de 14.5F tratadas con los anticuerpos a testar, con proteínas de fusión clusterizadas ephrina-B1Fc más ephrina-B2Fc o con un Fc control. En el caso de EphB2, el anticuerpo utilizado era también capaz de detectar EphB1 por no existir en el mercado uno exclusivo de EphB2. En primer lugar, las proteínas de fusión confirmaron la respuesta de los receptores EphB2 y EphB3 a su estimulación, aumentando significativamente la fosforilación de los residuos de tirosina, algo que, en el caso de EphB2, había sido ya descrito en otros sistemas celulares (*Nakada y cols., 2004; Groeger y Nobes, 2007*). Por el contrario, tanto los anticuerpos anti-EphB2 como aquellos específicos de EphB3 inducen en las células niveles de fosforilación en tirosina total y específica más bajos que los controles.

Una vez confirmada la naturaleza inhibidora, no activadora, de los anticuerpos utilizados en nuestro estudio comprobamos que en los RTOCs la organización histológica del epitelio y la morfología de las células epiteliales se alteraban pareciéndose a la de los cortes tímicos respectivos que se observaban *in situ*. Es decir, el modelo reproduce, parcialmente al menos, el fenotipo epitelial de los timos mutantes y WT. La cuantificación de los procesos epiteliales de cada condición confirma la retracción de los procesos epiteliales de las TECs EphB2^{-/-} o de las WT tratadas con anticuerpos anti-EphB2 y la pérdida de las ramificaciones laterales de los procesos epiteliales en el caso de los timos EphB3^{-/-} o de RTOCs WT tratados con anticuerpos anti-EphB3, que resulta en células elongadas en perpendicular al límite de la sección.

Es sobradamente conocido que Eph y ephrinas modulan el citoesqueleto y la adhesión celular (*Noren y cols., 2009*). Eph y ephrinas “remodelan”, con el concurso de GTPasas, los procesos celulares controlando la actividad de las integrinas y la reorganización de la red de actina (*Mellitzer y cols., 2000; Klein, 2001; Kullander y Klein, 2002; Ting y Boyd, 2008*). A la vista de la variedad de fenotipos observados, las modificaciones parecen específicas y difíciles de predecir. Concretamente, EphB2 y EphB3 regulan la

morfología de las espinas dendríticas neuronales (*Henkemeyer y cols., 2003*). La falta de señalización mediada por ephrina-B2 elonga las células musculares e induce la formación de lamelipodios (*Foo y cols., 2006*), y MSC aisladas de médula ósea tratadas con proteínas de fusión EphB2-Fc o EphB4-Fc se redondean y disminuyen de tamaño mientras el tratamiento con ephrina-B1Fc o ephrina-B2Fc, sus principales ligandos, no tienen efectos (*Arthur y cols., 2011*). Algo similar habíamos observado previamente en RTOC establecidos con timocitos DP y TECs fetales, donde el tratamiento con ephrina-B1Fc inducía retracción de los procesos celulares, convirtiendo las TECs estrelladas en células redondeadas (*Alfaro y cols., 2007*).

Estos datos confirman, por tanto, nuestra idea de que en los timos deficientes en EphB, una de las causas de las alteraciones en las interacciones timocitos-TEC, cruciales para la correcta maduración de las dos poblaciones tímicas, es la alteración del citoesqueleto de las TEC debido a la falta de señalización a través de EphB2 o EphB3 que resulta, finalmente, en acortamiento o eliminación de los procesos epiteliales dificultando las mencionadas interacciones “físicas” entre timocitos y TECs.

La deficiencia en EphB podría cursar también con ausencia o reducción de las células linfoides implicadas en la maduración epitelial o de las señales moleculares implicadas

Numerosas moléculas pertenecientes a la familia del TNF y sus receptores, TNFR, así como otras de distintas vías de señalización vinculadas al factor de transcripción NF- κ B son necesarios para la maduración del epitelio medular en procesos donde son necesarios contactos célula a célula (*Lucas y cols., 2016*). Ya hemos discutido el posible significado a este respecto de las alteraciones en los procesos celulares que ocurren en las TECs mutantes y ahora veremos los observados en las poblaciones linfoides implicadas en estos procesos. Teniendo en cuenta que la señalización mediada a través del par RANK/RANKL se considera implicada en la maduración inicial de las mTEC, mientras que, postnatalmente, el proceso requiere de la cooperación entre esas moléculas, CD40/CD40L y, posiblemente, alguna más (*Lucas y cols., 2016*); que, por otro lado, sabemos que las células que activan mTECs embrionarias no expresan CD40L (*White y cols., 2008*) y que nuestro estudio se ciñe principalmente al desarrollo fetal

del epitelio, analizamos la condición de las células que intervienen en estos procesos en dicho periodo que utilizan RANK/RANKL como vía de señalización.

En el timo adulto, la activación RANK/RANKL está mediada por células CD4⁺ seleccionadas positivamente (*Klein y cols., 2014; Shah y Zuniga-Pflucker, 2014*). Por el contrario, en el embrionario, las células inductoras linfoides (LTi) RORγt⁺ y células T canónicas Vγ5⁺ (*Rossi y cols., 2007c; Roberts y cols., 2012*) son las células responsables del inicio de la maduración del epitelio medular. Presumiblemente, también estén implicadas en el proceso células iNKT que expresan RANKL y CD40L, y cuya ausencia resulta en reducción de mTEC AIRE⁺ (*White y cols., 2014*). Por otro lado, puesto que ratones dKO para células RORγt⁺ y Vγ5⁺ muestran el mismo fenotipo que los mutantes en los que falta uno solo de los dos tipos celulares, sugiriendo que sinergizan entre sí (*Roberts y cols., 2012*), analizamos la condición de las células T Vγ5⁺ para conocer si alteraciones en su número podrían estar dificultando las interacciones timocitos/TECs necesarias para la maduración del epitelio medular observadas en los timos deficientes en EphB, como antes deducíamos para las TECs. Nuestros resultados demuestran una menor proporción de células CD45RB⁺Vγ5⁺ en los timos mutantes, estadísticamente significativa en los timos EphB2LacZ y EphB3^{-/-}, pero no en los EphB2^{-/-}, indicando que en los timos mutantes la posibilidad de interacciones célula-célula entre timocitos y TEC es menor que en los WT. Por otro lado, los valores encontrados en los timos WT se correspondían con los descritos previamente por otros autores (*Erb y cols., 1995*).

En cualquier caso, dado que no estábamos ante una condición de “todo o nada” si no ante diferencias cuantitativas en la proporción de células linfoides estimuladoras de las TECs cuyos procesos celulares se han acortado o, incluso en algunas zonas, desaparecido, parece clave conocer la condición de la expresión de RANK y RANKL en las TECs y en las células linfoides fetales, respectivamente, de los timos mutantes. No obstante, no debemos olvidar que esto es una mera aproximación fenotípica al problema pues desconocemos el número de moléculas de uno u otro tipo necesario para transmitir la señal adecuada para disparar la maduración epitelial. El análisis por citometría de flujo de la proporción de células Vγ5⁺ que expresan RANKL en timos fetales WT y mutantes muestra que dicho porcentaje era significativamente más bajo en los timos EphB2^{-/-}, más alto en los EphB3^{-/-} e igual en los EphB2LacZ respecto a la condición WT. No obstante, refiriendo estos datos a la población tímica total, o sea,

considerando el porcentaje de células $V\gamma 5^+RANKL^+$ en los timos totales, todos los mutantes muestran valores significativamente más bajos que los WT. En el caso de RANK se valoraron por qPCR los transcritos presentes en TECs totales de 15.5F aisladas por *sorting*. En este caso, ninguno de los tres mutantes muestra diferencias significativas respecto a los valores control. Globalmente, por tanto, estos resultados apoyan la posibilidad de que en los timos mutantes la señalización a través del par RANK/RANKL sea menor, contribuyendo al retraso observado en la maduración del epitelio medular.

Si esta hipótesis es cierta, la estimulación suplementaria de la vía de RANK podría revertir total o parcialmente el fenotipo epitelial observado. Confirmamos, en primer lugar, como hemos hecho en otros apartados de este trabajo, el efecto de la falta de timocitos sobre la maduración epitelial cultivando FTOCs de 14.5F, WT y mutantes, durante 6 días en presencia (sin timocitos) o ausencia de 2'-dGuo (con timocitos). En los FTOC WT, la presencia de timocitos determina la maduración epitelial aumentando la proporción de mTEC maduras $CD40^{hi}CD80^+$ o $MHCII^{hi}UEA1^{hi}$. La situación en los FTOC mutantes es igual pero las proporciones de mTEC maduras obtenidas en presencia de timocitos es significativamente menor que en los FTOCs control. No había diferenciación epitelial ni en FTOC WT ni en mutantes cuando se eliminan los timocitos por adición de 2'-dGuo. Los resultados son, de nuevo, concluyentes en cuanto a la relevancia de los timocitos en la maduración del epitelio medular, algo repetidamente demostrado (*Lucas y cols., 2016*), y en señalar la implicación de la presencia/ausencia de EphB en el proceso.

Para apoyar nuestra idea del papel de la señalización RANK en el retraso de la maduración epitelial en timos deficientes en EphB, se trataron FTOCs alinfoides de 14.5F WT y mutantes con un anticuerpo agonista anti-RANK, que suple la ausencia de las células linfoides $RANKL^+$. Tanto en FTOCs WT como mutantes la estimulación no sólo recuperaba la proporción de células maduras $CD40^{hi}CD80^+$ o $MHCII^{hi}UEA1^{hi}$ si no que, en el caso de estos últimos, la recuperación permitía alcanzar los valores WT.

Estos resultados no sólo confirman resultados previos que ponían de manifiesto que la ausencia de la señalización mediada por RANK/RANKL bloqueaba la diferenciación del epitelio medular tímico (*Rossi y cols., 2007c; Akiyama y cols., 2008; Hikosaka y cols., 2008*), y que anticuerpos anti-RANK o RANKL recombinante regulan positivamente la

expresión de CD80 y de AIRE en los FTOCs tratados (Rossi y cols., 2007c; Mouri y cols., 2011), si no la relación entre estas moléculas y las EphB permitiendo explicar, al menos parcialmente, algunas de las características del epitelio tímico de ratones deficientes en dichas moléculas.

Curiosamente, ni la expresión de RANK ni la de LT β R valoradas por qPCR muestran diferencias significativas entre TECs WT y mutantes, luego los defectos han de estar en el menor número de células linfoides que pueden estimular las mTEC RANK⁺, como se demuestra en el caso de las células V γ 5⁺RANKL⁺. Algo parecido se deduce del hecho de que dos quimiocinas, CCL19 y CCL21, involucradas en timos adultos en la migración desde la corteza de timocitos CCR7⁺ seleccionados positivamente a la médula, muestran valores más bajos en las TECs mutantes, aunque no siempre significativamente. La falta de estas moléculas bloquea o reduce la llegada de los timocitos a la médula adulta, donde, además de sufrir selección negativa, inducen la maduración de las mTECs (Ueno y cols., 2004; Nitta y cols., 2009; Lkhagvasuren y cols., 2013), aunque presumiblemente otras moléculas como Plexina D1 (Choi y cols., 2013) y CCL17/CCL22 (Laan y cols., 2009; Hu y cols., 2015b) estén también implicadas.

Hay que considerar, sin embargo, que nuestra situación experimental no es igual porque los valores eran significativamente bajos a 15.5F, cuando ni hay definida una corteza y una médula, y el 95% de las células linfoides que contienen los timos en este estadio son DN con proporciones muy pequeñas de timocitos SP. No obstante, en ensayos en *transwell*, timocitos de 14.5F migran en respuesta a CCL19, aunque en menor medida que a CCL21, CCL25 y CXCL12 (Liu y cols., 2005) y nosotros habíamos demostrado que timocitos SP derivados de timos deficientes en EphB migran menos que los WT en respuesta a estas tres quimiocinas (Stimamiglio y cols., 2010). Podemos pensar que a lo largo del desarrollo y durante el periodo postnatal, los timos mutantes están atrayendo menos timocitos a la incipiente médula dificultando con ello las necesarias interacciones con las mTECs inmaduras y retrasando la maduración del epitelio medular. Tampoco hay que olvidar que CCL19 y CCL25 son ligandos de CCRL1, una molécula que define una población fetal CCRL1⁺ capaz de originar mTEC (Ohigashi y Takahama, 2014).

Con todo, los datos en la literatura que permiten aventurar una conexión directa o indirecta entre la falta de EphB y defectos en la señalización RANK/RANKL y/o en la

producción de las quimiocinas, CCL19 y CCL21, son muy escasos y difíciles de extrapolar a la condición aquí estudiada. Un factor que podría estar implicado en el proceso es Stat3, un factor de transcripción implicado en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, del que ya hemos hablado anteriormente (*Darnell, 1997; Hirano y cols., 2000; Levy y Darnell, 2002*). En linfocitos B, la señalización vía CD40 activa Stat3 (*Hanissian y Geha, 1997*) y se ha propuesto que también actuaría en el epitelio tímico activado por CD40 y RANK (*Lomada y cols., 2016*). En timo, la activación constitutiva de Stat3 aumenta la supervivencia de mTEC inmaduras, acumulándose mTEC MHCII^{lo} y obviando el requerimiento de las señales emitidas por los timocitos necesarias para la maduración de la médula. Por el contrario, la depleción de Stat3 reduce la celularidad mTEC y bloquea la formación de la red epitelial medular (*Lomada y cols., 2016*). Otros autores, por el contrario, han descrito que la depleción específica de Stat3 en células epiteliales medulares K5⁺ cursa con hipoplasia tímica, caída de timocitos DP y atrofia cortical, pero no medular (*Sano y cols., 2001*). Por otro lado, EphA4, EphB2 y EphB3 son capaces de fosforilar y activar Stat3 (*Lai y cols., 2004; Yuan y cols., 2004*). Todos estos datos nos permiten especular que, en ausencia de EphB2 o EphB3, Stat3 no se activaría (o lo haría en menor medida), debido a las dificultades para interaccionar de timocitos y TEC, que conlleva una señalización reducida de la vía de RANK. Una estimulación adicional de RANK mediante anticuerpos agonistas recuperaría el sistema aumentando la activación de Stat3.

La señalización mediada a través de EphB2, EphB2LacZ o EphB3 no afecta por igual el desarrollo de los distintos componentes tímicos

Este trabajo ha demostrado claramente que EphB2 y EphB3 son moléculas necesarias para el correcto desarrollo y maduración, tanto de los progenitores linfoides que colonizan el primordio tímico como de las TECs corticales y medulares. Sin embargo, nuestros resultados resaltan que a pesar de que ambas moléculas son importantes e intervienen en la regulación de los mismos procesos, el papel jugado por cada una de ellas no es exactamente igual. Aunque las diferencias entre los tres tipos de mutantes estudiados han sido señaladas puntualmente en los respectivos apartados, en esta sección queremos valorar globalmente lo que representan cada una de estas moléculas en el comportamiento de las distintas poblaciones tímicas estudiadas y de

sus capacidades de supervivencia, proliferación y diferenciación. Es necesario advertir, no obstante, que se trata de una valoración general donde hay que tener en cuenta que la variabilidad entre muestras y la plasticidad del sistema Eph/ephrinas hace difícil alcanzar conclusiones definitivas.

La importancia de EphB2 es mayor que la de EphB3 para toda una serie de parámetros analizados, de manera que su ausencia resulta en un fenotipo más severo. Dichos parámetros incluyen: el porcentaje de las poblaciones linfoides, su nivel de proliferación y el retraso en la maduración de las poblaciones DN. En cuanto al porcentaje de células apoptóticas es mayor en los estadios estudiados en timos EphB3^{-/-} que en EphB2^{-/-}, porque la maduración de las poblaciones linfoides es más rápida en los primeros y alcanzan antes los estadios DN4/DP en los que la muerte celular es mayor, aunque esto no se aprecie aún a 13.5F ni hayamos evaluado la muerte por subpoblaciones DN y DP. En el caso del componente epitelial, la ausencia de EphB2 genera una mayor acumulación de células EpCAM⁺CD45⁻ que la de EphB3, a lo que no contribuye el porcentaje de TECs apoptóticas, así como de TECs inmaduras MTS20⁺ y un mayor retraso en la maduración de las poblaciones TECs medulares maduras UEA1^{hi}, MHCII^{hi}, CD40^{med/hi}, CD80⁺ y AIRE⁺, lo que podría estar relacionado con un menor porcentaje de células RANKL⁺ en la población Vy5⁺, implicadas en la maduración del epitelio medular, en estos timos deficientes en EphB2. Esta mayor relevancia de EphB2 para el desarrollo del epitelio medular ya había sido puesta de manifiesto en experimentos en los que lóbulos tímicos alinfoides de 13.5F deficientes en EphB2^{-/-} trasplantados bajo la cápsula renal de ratones WT mostraban tras 4 semanas una mayor fragmentación de las áreas medulares K5⁺ que aquellos establecidos con lóbulos tímicos EphB3^{-/-} (*García-Ceca y cols., 2009b*).

Es importante indicar que en la mayoría de estos parámetros la presencia de una señal *reverse* mediada por EphB2 recupera parcial, pero no totalmente, el fenotipo EphB2^{-/-}, sugiriendo que dicha señal es accesorio sumándose a la señalización *forward* mediada por EphB2, que parece la realmente esencial para gobernar el comportamiento de todos estos elementos tímicos. Esta condición de señalización accesorio o adicional de la señal *reverse* de EphB2 ya había sido puesta de manifiesto antes en distintos procesos que acontecen tanto en el timo como en otros sistemas celulares (*Davy y Soriano, 2005*). Así, sólo en algunos casos la señal *reverse* determina por completo el

fenotipo. Henkemeyer y colaboradores demostraron que los defectos en la migración de los axones neuronales y en la comisura anterior de ratones EphB2^{-/-} no ocurrían en ratones EphB2LacZ (Henkemeyer y cols., 1996). También, la recuperación de la señal *reverse* mediada por EphB2 es esencial para el correcto desarrollo de la retina en vertebrados (Birgbauer y cols., 2000) o para la proyección de los axones contralaterales del núcleo coclear ventral (Hsieh y cols., 2010).

En relación con la maduración linfoide, ratones SCID que reciben progenitores Lin⁻ de médula ósea de ratones EphB2LacZ tienen un fenotipo tímico menos severo que los que reciben progenitores EphB2^{-/-}, con cierta recuperación del compartimento DP, que en las quimeras EphB2^{-/-} está enormemente reducido. Además, en estas últimas quimeras el porcentaje de timocitos DP apoptóticos aumenta significativamente pero no en las establecidas con células EphB2LacZ. En ellas, sin embargo, los progenitores EphB2LacZ no son capaces de diferenciar a timocitos SP que requieren señales *forward* mediadas por EphB2 y EphB3 (Alfaro y cols., 2011). Igualmente, el número de conjugados establecidos entre timocitos y TECs disminuye cuando se usan DP deficientes en EphB2 o EphB3, pero aumentan con timocitos DP EphB2LacZ, aunque la señal *reverse* transmitida por las células DP EphB2LacZ no es capaz de activar plenamente los timocitos a través de su TcR (Alfaro y cols., 2011). En el caso del epitelio, la señal *reverse* de EphB2 tampoco es capaz de rescatar las TECs de apoptosis (García-Ceca y cols., 2013).

La señalización mediada por EphB3 parece más importante que aquella transmitida por EphB2 en el caso de la proliferación epitelial, de manera que en los timos deficientes en EphB3 el porcentaje de TECs en ciclo es menor que en los timos EphB2^{-/-}. Este dato está poniendo de relieve la preponderancia de la señalización *forward* mediada por EphB3 para el desarrollo del epitelio cortical, que es el que sufre la mayor expansión durante los primeros estadios del desarrollo, mientras que el crecimiento del epitelio medular acontece a partir de 17.5F y, sobre todo, en el periodo postnatal. Además, EphB3 es más relevante que EphB2 para la diferenciación del epitelio cortical de manera que en su ausencia hay un retraso en la maduración de las poblaciones Ly51⁺, CD205⁺, CD40^{med/hi}, MHCII⁺ o β5t⁺ mayor que el observado en ausencia de EphB2.

En general, los datos en la literatura apoyan que señales *forward* mediadas a través de EphB3 son menos determinantes que aquellas que implican a EphB2. En los

experimentos con quimeras antes señalados, los progenitores EphB3^{-/-} inyectados en ratones SCID bloquean parcialmente la diferenciación T a nivel del compartimento DN con caída del porcentaje de timocitos DP, pero el bloqueo es mucho más severo, como decíamos, cuando los progenitores inyectados son EphB2^{-/-} (Alfaro y cols., 2011).

Resultados sobre el papel jugado por todas estas moléculas en la colonización linfóide del timo embrionario y adulto, que, en parte, ya hemos comentado, aunque resultan contradictorios confirman la preponderancia de las señales *forward* de EphB2 sobre las de EphB3 y la complementariedad de la señal *reverse* mediada por EphB2. En ensayos *in vitro*, progenitores de médula ósea adultos Lin⁻ EphB2LacZ colonizan FTOCs alinfóides igual que las células WT, recuperando la menor colonización de progenitores EphB2^{-/-}. Sin embargo, en ensayos similares el grado de migración de timocitos totales dentro de los lóbulos tímicos es igual utilizando células EphB2^{-/-} y EphB2LacZ. Además, en ensayos de migración a estímulos hapto- y quimiotácticos se da una condición intermedia: la migración de progenitores Lin⁻ y timocitos EphB2^{-/-} cae significativamente mientras la de células EphB2LacZ muestra cierta recuperación (Stimamiglio y cols., 2010). *In vivo*, por otra parte, la colonización tímica de progenitores Lin⁻ EphB2^{-/-} o EphB3^{-/-} en timos adultos se reduce respecto a la de precursores WT, siendo significativamente menor con los EphB2^{-/-} y aconteciendo cierta recuperación, aunque no total, cuando se ensayan progenitores EphB2LacZ. Igualmente, cuando se ensaya la capacidad de progenitores WT para colonizar estromas tímicos mutantes, de nuevo, la menor colonización sucede con estromas EphB2^{-/-} y la recuperación con estromas EphB2LacZ es muy parcial (Alfaro y cols., 2015).

Es importante hacer hincapié en esta especificidad de los fenotipos encontrados, de hecho ya resaltada en nuestros estudios morfológicos previos (García-Ceca y cols., 2009a), porque otros autores, como ya hemos señalado, han justificado la falta de fenotipos tímicos de ratones deficientes en Eph o ephrinas sobre la idea de que la expresión de otras moléculas de esta familia suplían la falta (Shimoyama y cols., 2002; Kawano y cols., 2012; Jin y cols., 2014). No obstante, explicar los mecanismos subyacentes a estas diferencias no es fácil. Aunque, en general, las rutas de activación de EphB2 y EphB3 son comunes, presumiblemente, el sistema exhibe cierta especificidad en relación a los mediadores citoplásmicos de las vías de señalización.

Esta especificidad es dependiente del tipo celular y del contexto de la estimulación celular, y está relacionada también con el hecho de que Eph/ephrinas coordina, como ya hemos discutido, otras vías de señalización generando redes que actúan conjuntamente para controlar la respuesta final (*Arvanitis y Davy, 2008*). En esencia, en el timo, como en otros órganos, el balance global y el tipo de señales mediadas por Eph y ephrinas, condiciona cuantitativa y cualitativamente la respuesta celular, lo que configura un sistema extremadamente plástico en el que unos pocos cambios producen fenotipos muy distintos (*Wilkinson, 2003; Pasquale, 2005*).

Ratones deficientes en EphB2, EphB3 y EphB2LacZ no muestran aparentemente signos de defectos inmunológicos

A pesar de las importantes alteraciones en la organización histológica del timo, del reducido número de timocitos y del descenso de las proporciones de células $\beta 5t^+$ y AIRE⁺ durante el periodo fetal tardío y postnatal, los ratones deficientes en EphB2, EphB3 o los EphB2LacZ son capaces de vivir en condiciones de no esterilidad, sin mostrar aparentemente déficits inmunológicos. Aunque no se han realizado ensayos inmunológicos completos, puesto que no era ese el objetivo de nuestro trabajo, cuando los animales fueron sacrificados no se apreciaron evidencias de malignidad, infecciones ni otras alteraciones que nos sugieran la existencia de dichos déficits. Además, no habíamos observado en estudios previos alteraciones en los órganos linfoides periféricos, aparte de un menor número de linfocitos T, como en el timo (*Alfaro y cols., 2008; Munoz y cols., 2009*). Estas alteraciones numéricas no conllevaban, sin embargo, variaciones en las proporciones de las subpoblaciones T definidas por la expresión de los marcadores CD4/CD8. No había tampoco, cambios aparentes en la histología del bazo o ganglios linfáticos ni en la distribución topológica de las poblaciones T, B o de macrófagos en ellos (*Alfaro y cols., 2008; Munoz y cols., 2009*).

También un estudio previo había revelado que los ratones deficientes en EphB2 y/o EphB3 mostraban escasas variaciones en el repertorio TcR $\alpha\beta$ de células CD4⁺ tímicas y de los ganglios linfáticos periféricos (*Munoz y cols., 2009*). En todos los mutantes, solamente se observó un aumento de la proporción de células V $\beta 3^+$ en ambos órganos.

Había también otras diferencias específicas mínimas de los distintos genotipos: los ratones EphB2^{-/-} mostraban en periferia un incremento en linfocitos T Vβ6⁺ y un descenso de la proporción de Vβ8.3⁺ y Vβ11⁺, mientras en los EphB3^{-/-} la proporción de timocitos Vβ11⁺ y Vβ14⁺ disminuía significativamente y en los dobles KO, tanto en timo como en ganglio, había un aumento de células Vβ5⁺ y una disminución de Vβ2⁺ (Munoz y cols., 2009).

Los datos en la literatura acerca del estatus inmunológico en relación con la falta o sobreexpresión de Eph y/o ephrina son escasos y contradictorios. Luo y colaboradores (Luo y cols., 2004) describieron alteraciones en las respuestas inmunes de ratones deficientes en EphB6. Células T de estos ratones responden escasamente *in vitro* a la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y muestran una disminución de la hipersensibilidad retardada y en las respuestas autoinmunes, mientras las respuestas mediadas por linfocitos B no sufrían alteraciones (Luo y cols., 2004). Sin embargo, otros autores no han observado ningún fenotipo en ratones deficientes en EphB6 (Shimoyama y cols., 2002). Recientemente, este último grupo tampoco ha encontrado alteraciones inmunológicas en ratones deficientes en EphB1, EphB2, EphB3 y EphB6 (Kawano y cols., 2012). Sorprendentemente, tampoco la eliminación selectiva de EphB4 en TECs cursa con defectos en el desarrollo de los timocitos o en la funcionalidad T (Jin y cols., 2014). Hay que advertir, no obstante, que en estos ratones la delección del gen no era completa. Por el contrario, este mismo grupo describió que mientras la delección de ephrina-B1 o ephrina-B2 en timocitos no afecta sustancialmente el fenotipo tímico (Jin y cols., 2011; 2012), el doble mutante ephrina-B1/ephrina-B2 condicionado a timocitos no sólo muestra alteraciones en los linfocitos T sino también en la estructura de la médula tímica (Luo y cols., 2011a). De hecho, este doble KO es menos susceptible a encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), exhibiendo menor infiltración T del parénquima nervioso, debido a bloqueo de la quimiotaxis linfoide, y menores respuestas proliferativas T específicas a mielina (Luo y cols., 2016). Este estudio concluye que ephrina-B1 y ephrina-B2 serían necesarias para el óptimo desarrollo de células T proinflamatorias Th1 y Th17. Anteriormente, estos autores alcanzaron resultados similares utilizando estos ratones doble KO condicionado en el estudio de la artritis inducida por colágeno. En dichos ratones, los títulos de anticuerpos específicos a colágeno eran más bajos y la colaboración T-B

estaba comprometida, así como la capacidad de los linfocitos T para infiltrar los focos artríticos (Hu y cols., 2015a).

También nuestro grupo ha descrito que la delección específica de ephrina-B1 y/o ephrina-B2 en TECs cursa con una reducción en la proporción de células $TcR\alpha\beta^{hi}CD69^{hi}$, dentro de la subpoblación de timocitos DP, más o menos severa dependiendo del *background* genético de los ratones (Cejalvo y cols., 2013), algo que también habíamos apreciado en el timo de ratones deficientes en EphA4 (Munoz y cols., 2006). En estos animales, en los que también se acumulaban células DN3, podría haber defectos tanto en la selección positiva de los $TcR\alpha\beta$ como en la de su cadena β en el compartimento DN. Resaltábamos entonces, que el factor de transcripción Krox20/Egr2, que es un regulador directo de la expresión de EphA4 en otros tipos celulares, está implicado en la transición de los timocitos DN a DP (Carleton y cols., 2002) y en la selección intratímica (Shao y cols., 1997).

Con todo, es difícil, entender como las importantes alteraciones histológicas observadas en los timos deficientes en EphB no cursen con defectos inmunológicos consecuencia de alteraciones en la selección positiva y/o negativa de los timocitos, contraviniendo la conocida relevancia de las interacciones T-TECs en estos procesos que venimos proclamando a lo largo del presente trabajo. En este sentido, hay que apuntar que nuestros resultados demuestran un retraso en la maduración del epitelio tímico, consecuencia de una menor colonización linfoide del primordio del órgano y alteraciones en su supervivencia, proliferación y diferenciación consecuencia, presumiblemente, de alteraciones en distintas moléculas implicadas en todos y cada uno de estos procesos, pero, independiente de las alteraciones morfológicas observadas en el órgano y sus poblaciones celulares, todas ellas están presentes y los defectos en las moléculas estudiadas son cuantitativos nunca cualitativos, por lo que podemos pensar, hasta la realización de los estudios inmunológicos adecuados, que las interacciones T-TECs establecidas son suficientes para una adecuada maduración de los linfocitos T en los ratones mutantes. Por otra parte, esta condición no es exclusiva de los ratones deficientes en EphB. La delección condicionada de Stat3 en mTECs $K5^{+}$, a la que antes aludíamos, que cursa también con alteraciones en la organización histológica medular, en su celularidad y con menos células $MHCII^{hi}AIRE^{+}$, tampoco conlleva reacciones autoinmunes (Lomada y cols., 2016), algo que tampoco sucede en

ratones Foxn1^{Δ/Δ}, cuyo timo, ya hemos señalado se asemeja a los aquí estudiados (*Su y cols., 2003*). Sería posible explicar estos resultados, al menos en parte, considerando que con unas pocas áreas del estroma tímico inalteradas podría conseguirse una maduración funcional normal de los timocitos (*Revest y cols., 2001; Osada y cols., 2006*). Otros autores han ido más lejos, asegurando que unas “perfectas” interacciones T-TEC no son esenciales para la generación de un repertorio T inmunológicamente competente (*Benz y cols., 2004*).

Futuras investigaciones

Nuestros estudios sobre Eph/ephrinas-B y timo hace mucho que demostraron la relevancia de estas moléculas en distintos procesos del desarrollo y la homeostasis del órgano, así como su implicación en muchas etapas del funcionamiento tímico, algo muy poco frecuente, salvo en el caso de algunos morfógenos y de Foxn1. En el presente estudio confirmamos la relevancia de EphB2 y EphB3 en el desarrollo del componente epitelial tímico.

Ambas moléculas son necesarias para explicar los fenotipos encontrados pero la falta de EphB2 resulta en mayor severidad en varios parámetros, mientras la señal *reverse* transmitida por las células EphB2LacZ recupera sólo algunos parámetros y rara vez permite alcanzar los valores WT. No obstante, los fenotipos muestran un alto grado de especificidad que permite asumir que la falta de EphB3 cursa con mayores defectos en el desarrollo de la corteza tímica mientras EphB2 está particularmente implicada en el de la médula.

Todos los timos mutantes muestran menor celularidad linfoide y epitelial y retraso en la maduración de los dos componentes tímicos, lo que se debe a una menor colonización de progenitores linfoides y del grado de proliferación celular y, en menor medida, a una aumento de su muerte, todo ello vinculado al retraso en la maduración de las diferentes poblaciones linfoides y epiteliales.

Todos estos defectos están relacionados con alteraciones en distintas vías de señalización implicadas en supervivencia, proliferación y diferenciación de los componentes tímicos como IL7/IL7R, Dll4/Notch, TcRβ, FGF7/FGFR2IIb, RANK/RANKL y Quimiocinas (CCL19, CCL21, CCL25) y sus receptores, consecuencia de la falta de

señalización mediada por EphB2 o EphB3 en relación con las interacciones timocitos-TEC imprescindibles para la función tímica.

Quedan, no obstante, algunos puntos cruciales por resolver de los que, aunque tenemos algunos resultados parciales, necesitamos evidencias. Sería necesario:

- 1) Identificar las vías de señalización que explican las diferencias en los fenotipos mostrados por los timos deficientes en EphB2 y EphB3.
- 2) Demostrar el potencial de supervivencia, proliferación y diferenciación de cada progenitor epitelial mutante.
- 3) Evaluar exhaustivamente los potenciales inmunológicos *in vivo* e *in vitro* de los linfocitos T y B mutantes, y
- 4) Dilucidar el papel que estas moléculas, claramente implicadas en el desarrollo del epitelio tímico, juegan en el envejecimiento del timo, proceso en el que el componente epitelial parece ser clave.

A la vista de los resultados obtenidos y de su confrontación con los existentes en la bibliografía, la conclusión general de nuestro trabajo es que EphB2 y EphB3 son necesarias para el desarrollo tímico. Su ausencia provoca profundas alteraciones del epitelio tímico y, en menor medida, del componente linfoide, quizás porque la expresión de las dos EphB y de sus ligandos ephrina-B1 y ephrina-B2 sea más baja en timocitos. Tales alteraciones son consecuencia de la acumulación de defectos en la celularidad del órgano, del grado de proliferación y muerte, del retraso en la maduración de sus componentes, y de los cambios en la morfología y organización epitelial.

Concretamente, nuestros resultados indican:

1. Las dos moléculas son necesarias para la correcta maduración tímica, pero sus efectos son específicos. La ausencia de EphB2 produce fenotipos más severos en algunos, pero no en todos, los parámetros estudiados. La señal *reverse* de los timos EphB2lacZ sólo en algunas ocasiones recupera parcialmente los fenotipos WT.
2. Todos los timos mutantes muestran hipocelularidad a partir de 13.5F, antes en el caso de los timocitos. Numéricamente, las diferencias entre timos WT y mutantes son enormes a partir de 14.5F-15.5F.
3. La hipocelularidad linfoide se inicia con una menor llegada de progenitores linfoides PIR^{A/B+}, cuyo número es normal en hígado fetal, consecuencia de defectos en la producción de quimiocinas (CCL21, CCL25, CXCL12) por los epitelios tímicos mutantes que los atraen.
4. Esta hipocelularidad linfoide aumenta sustancialmente con el mayor porcentaje de células CD45⁺ mutantes apoptóticas desde 13.5F pero, sobre todo, por la reducción en el índice de proliferación linfoide que contribuye, a su vez, a un retraso en su diferenciación, con acumulación de células DN1 y DN2 y bajas proporciones de DN3, particularmente en timos EphB2^{-/-}. Este comportamiento está íntimamente relacionado con una menor actividad en los timos mutantes de las vías de señalización implicadas en estos procesos (IL7/IL7R, DII4/Notch, selección TcR β).

5. La baja proporción de progenitores linfoides de los timos mutantes correlaciona, a su vez, con el retraso en la maduración de TEC inmaduras MTS20⁺. Las interacciones timocitos-TEC son, por tanto, fundamentales para la maduración epitelial desde el comienzo de la colonización tímica y no desde el estadio DN3 como había sido apuntado.
6. La condición del epitelio es igual a la del componente linfoide: timos mutantes muestran mayor proporción de TEC apoptóticas y, sobre todo, menores porcentajes de células en proliferación, lo que influye en el retraso de la maduración tanto de las cTEC (Ly51⁺, CD205⁺) como de las mTEC (UEA1⁺), afectando incluso a las poblaciones que expresan marcadores funcionales, como CD40, CD80, MHCII, β 5t o AIRE.
7. En los primeros estadios (12.5F-13.5F), las TECs más afectadas por la baja proliferación son células inmaduras MTS20⁺ o Ly51⁻UEA1⁻, y células corticales Ly51⁺UEA1⁻. Si bien estos cambios no coinciden con variaciones en la expresión de Foxn1, clave para la diferenciación del epitelio tímico, sugiriendo que actuaría antes que las EphB, sí lo hacen con la presumible caída en los timos mutantes de la señalización mediada por FGFR2IIIb, máximo regulador de la proliferación epitelial tímica. También, la máxima expresión de Eph y ephrinas-B en el epitelio tímico temprano contribuye a estos resultados.
8. La ausencia de EphB2 afecta, particularmente, el desarrollo del epitelio medular mientras la de EphB3 es más importante para el del epitelio cortical, si bien ambas EphB son necesarias para la correcta maduración de los dos compartimentos tímicos. La recuperación de la señal *reverse* mejora algunos aspectos del fenotipo epitelial de los timos deficientes en EphB2, pero sin llegar al fenotipo WT, lo que incide en la relevancia de la señal *forward* de EphB2.
9. El estudio de quimeras con estromas y/o progenitores linfoides mutantes demuestra que la falta de EphB2 y EphB3 ocasiona desequilibrios en la señalización mediada por estas moléculas que son los responsables de los fenotipos observados, siendo tales controles distintos en el caso de la celularidad y en el de la maduración del epitelio tímico. Así, en estas

condiciones experimentales, se confirma que la señal *forward* mediada por EphB2 es más importante que la de EphB3 para la celularidad tímica, que sólo alcanza valores WT cuando TECs reciben señales *forward* y *reverse* mediadas por EphB2. Por otro lado, cualquier señal *forward* transmitida en TECs por EphB2 o EphB3 junto con cualquier señal *reverse* dirige la diferenciación epitelial hacia un fenotipo medular.

10. Las alteraciones que la falta de señales mediadas por EphB2 o EphB3 provocan en la morfología de las TECs, junto con el menor índice de supervivencia de las mismas y de los timocitos, hace que las interacciones timocitos-TECs y TECs-TECs se vean dificultadas en los timos mutantes ocasionando que, al menos, una parte de las células tímicas no reciban las señales adecuadas para su correcta diferenciación.
11. Aparentemente la señalización RANK/RANKL, capital para la maduración del epitelio medular, está alterada en los timos fetales mutantes donde hay menos células $V\gamma 5^+ \text{RANKL}^+$, como demuestra el hecho de que anticuerpos agonistas anti-RANK recuperan los porcentajes WT de mTECs maduras en lóbulos alinfoides mutantes.



RESUMEN

Papel de los receptores EphB2 y EphB3 en el desarrollo tímico temprano

Introducción

El timo es un órgano linfoide primario responsable del desarrollo funcional de las células T inmunocompetentes. Está compuesto, principalmente, por dos elementos: el epitelio tímico (TEC) y las células linfoides cuyos progenitores colonizan el primordio del órgano alrededor del día 11.5F (*Gordon y cols., 2004*). Ambos componentes organizan en el timo adulto dos áreas histológica y funcionalmente diferenciadas, corteza y médula, donde acontece la selección positiva y negativa, respectivamente, de los receptores antigénicos de los timocitos en desarrollo, claves para la funcionalidad inmune (*Blackburn y Manley, 2004*).

La maduración del epitelio y los timocitos conlleva interacciones célula a célula en la que estudios anteriores de nuestro grupo habían implicado a los receptores tirosina quinasa Eph y sus ligandos, las ephrinas, y más concretamente, a las EphB2 y EphB3. Nuestros estudios recientemente resumidos (*García-Ceca y cols., 2015*) relacionan estas moléculas con muchos de los procesos que suceden en el timo, pero no clarifica su origen durante la ontogenia del órgano ni los componentes celulares y moleculares específicamente implicados. Curiosamente, en ausencia de EphB2 o EphB3 los timos son hipoplásicos (*Alfaro y cols., 2008*) y muestran profundas alteraciones en la red epitelial que empiezan pronto en el desarrollo (*García-Ceca y cols., 2009a*), pero muchos menos defectos en el componente linfoide (*Alfaro y cols., 2008*).

Objetivos y Resultados

Con este trabajo pretendemos una mejor caracterización de los fenotipos tímicos observados previamente en ratones deficientes en EphB2 o EphB3, particularmente de su componente epitelial, y conocer cuándo aparecen y a qué son debidas tales alteraciones. Además pretendemos determinar, mediante el estudio del timo de ratones EphB2LacZ, la importancia de la señalización *forward* y *reverse* de EphB2 en el desarrollo tímico. Para ello analizaremos cuatro elementos característicos de los timos deficientes en EphB2 o EphB3, como son:

- 1) Su baja celularidad linfoide y epitelial hasta ahora no cuantificada y sólo descrita en base al pequeño tamaño del órgano.
- 2) Las alteraciones en la aparición, supervivencia, proliferación y maduración de los distintos tipos de TECs que resultan en los profundos cambios observados en los timos deficientes adultos.
- 3) La relevancia de las interacciones y tipo de señalización mediada por EphB2 o EphB3 entre timocitos y TECs para entender el fenotipo epitelial de los mutantes.
- 4) La especificidad de los fenotipos generados por la falta de cada EphB que se refleja en la distinta morfología y desarrollo del epitelio tímico de mutantes deficientes en EphB2 o EphB3.

Nuestros resultados confirman que la hipocelularidad, a partir de 13.5F, pero no antes, es una de las principales características de los timos mutantes, tanto en la población linfoides CD45⁺ como en la epitelial EpCAM⁺CD45⁻. La hipocelularidad linfoides comienza ya a 12.5F, debida en gran medida a la menor colonización de los progenitores linfoides provenientes del hígado fetal, por defectos en la expresión de las quimiocinas CCL21, CCL25 y CXCL12 producidas por el epitelio tímico mutante, y por una reducción en su proliferación una vez que alcanzan el primordio tímico. En términos absolutos, las diferencias entre timos WT y mutantes son enormes a partir de 14.5F, cuando las interacciones T-TECs están bien establecidas y sus defectos, debido a la falta de señalización Eph/ephrinas-B, resultan presumiblemente en cambios en otros sistemas de señalización claves para la proliferación y diferenciación linfoides (IL7/IL7R, Dll4/Notch1 y selección TcR β), que conducen a una acumulación de células DN1 y DN2 y a una caída de las proporciones de células DN3 en los timos mutantes, mucho más acusada en los EphB2^{-/-}.

La maduración temprana de las TEC mutantes muestra también retrasos relacionados con los observados en las poblaciones linfoides y obedecen, presumiblemente, a las mismas causas, de manera que el menor número de progenitores linfoides que colonizan el primordio tímico correlaciona con bajos porcentajes de TECs inmaduras MTS20⁺ a 12.5F, pero no después donde hay una acumulación de estas células y, en menor medida, de células MTS20⁻. Esta hipótesis fue confirmada en ensayos *in vitro*,

donde la ausencia de timocitos en lóbulos tímicos de 13.5F cursaba con una acumulación de TECs inmaduras MTS20⁺ sugiriendo, por tanto, que los timocitos afectan la maduración temprana de las poblaciones epiteliales aunque también las interacciones TEC-TEC mediadas por EphB eran relevantes para la maduración del epitelio tímico.

Al analizar la aparición de las poblaciones típicas cTECs y mTECs, en base a la expresión de los marcadores Ly51 y UEA1, observamos como en todos los timos mutantes hay un retraso en la adquisición de Ly51 desde 13.5F y de UEA1 desde 17.5F. Este retraso se confirmó utilizando otros marcadores corticales (CD205, MHCII, β 5t y CD40) y medulares (MHCII, CD40, CD80 y AIRE). Más relevante, nuestros resultados indican que tanto EphB2 como EphB3 son moléculas necesarias para el correcto desarrollo del epitelio tímico, pero EphB3 parece más implicada en el desarrollo del epitelio cortical, y EphB2 en el medular. Por otro lado, la recuperación de la señal *reverse* de EphB2 en los timos EphB2LacZ, mejora la condición del epitelio EphB2^{-/-}, pero no recupera completamente el fenotipo WT. El análisis de poblaciones epiteliales definidas por nuevos marcadores confirma también el retraso en la maduración fetal del epitelio mutante, acumulándose, por ejemplo, células MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} y Cld3,4^{hi}SSEA1⁺ respecto a los WT y observándose menores números de TECs Cld3,4^{hi} en timos postnatales, cuando esta población tiene que expandirse, e incrementos en la proporción de células α 6^{hi}Sca-1^{hi} a 17.5F en timos EphB2^{-/-}.

Aparte del consignado retraso de la maduración linfóide y epitelial de los timos deficientes en EphB, nuestros resultados demuestran un mayor porcentaje de timocitos y TECs apoptóticas desde 13.5F en adelante. A 12.5F el retraso en la maduración epitelial no permite a las TECs mutantes recibir las señales apoptóticas y sus porcentajes no varían respecto a los valores control. Respecto de la proliferación de las TECs, aunque el patrón en células MTS20⁺ mutantes en los primeros estadios (12.5F-13.5F) y posteriores es similar al de las WT, la proporción de células en ciclo es significativamente menor. Por tanto, la caída del porcentaje de células MTS20⁺ en ciclo contribuye a la hipocelularidad epitelial especialmente al principio del desarrollo y el de las células MTS20⁻ a partir de 13.5F-14.5F. En este sentido, hasta 14.5F-15.5F las principales poblaciones epiteliales en ciclo son las Ly51⁻UEA1⁻ y las Ly51⁺UEA1⁻ que han de contribuir notablemente a la hipocelularidad, dado que en estos estadios se

produce en los timos WT la expansión de la corteza tímica. Estas alteraciones del ciclo epitelial mutante correlacionan con una reducción de la señalización en las TECs de la vía de FGFR2IIIb, implicada en la proliferación del epitelio tímico.

Distintas aproximaciones experimentales nos han permitido demostrar que las alteraciones observadas en los timos deficientes en EphB se debían, realmente, a la falta de estos receptores. *In vitro*, el bloqueo de la señalización Eph/ephrinas-B con proteínas de fusión en lóbulos WT de 13.5F cursa, como en los timos mutantes, con caída de la celularidad, acumulación de células MTS20⁺ y disminución de la proporción de MTS20⁻. *In vivo*, trasplantes de estromas y/o progenitores linfoides WT y/o mutantes resultan en fenotipos parecidos a los de los timos deficientes. Este estudio también confirmó que la señal *forward* mediada por EphB2 es más relevante que la mediada por EphB3 para el control de la celularidad tímica y que cualquier señal *forward* transmitida en TECs por EphB2 o EphB3 junto con cualquier señal *reverse* dirigen la diferenciación del epitelio hacia el fenotipo medular con, de nuevo, mayor relevancia de EphB2 que de EphB3. En estos experimentos, sin embargo, no queda tan clara la importancia de EphB3 para el desarrollo del epitelio cortical como se apreciaba en los estudios *in situ*.

Otros resultados demostraron de nuevo, que las interacciones timocitos-TECs y el papel jugado en ellas por Eph/ephrinas B, eran, sin duda, claves para entender los fenotipos encontrados en ausencia de la señalización transmitida por estas moléculas. En primer lugar, la ausencia de timocitos cursa, como decíamos, con retraso en la maduración epitelial. Además, los timos deficientes en EphB2 o EphB3 generan menos células *nurse* en general, y menos del complejo linfo-epitelial más frecuente. También los perfiles de expresión de EphB2 y EphB3 y sus ligandos, las ephrinas-B1 y -B2, en los dos componentes tímicos indican que, aunque todas ellas se expresan en ellos, hay una menor expresión de EphB y ephrinas-B en timocitos lo que podría explicar los menores efectos que tienen sobre éstos la falta de las moléculas. Además, EphB2 se expresa el doble en timocitos que EphB3 lo que, de nuevo, podría explicar la mayor severidad de la hipocelularidad y de los fenotipos linfoides en los timos EphB2^{-/-}. En este mismo sentido, la severidad de las alteraciones observadas en las poblaciones Ly51⁺UEA1⁻ y Ly51⁺UEA1⁻ mutantes a 12.5F y 13.5F, cuando esas poblaciones

predominan, correlacionan con la mayor expresión de las dos EphB y de su ligando la ephrina-B2.

El hecho de que la falta de la EphB afectara las interacciones entre timocitos y TECs como demuestran los cambios morfológicos observados en el epitelio tímico mutante, el alto número de TECs y timocitos apoptóticos, y la disminución de las proporciones de ciertas subpoblaciones linfoides, como las de las células $V\gamma 5^+ \text{RANKL}^+$, claves para la maduración de las TECs medulares, nos llevó a analizar si la estimulación adicional de ciertas vías de señalización establecidas a través de las interacciones timocitos-TECs y, por tanto, dificultadas en los timos mutantes, podría rescatar total o parcialmente los fenotipos mutantes. En concreto, vimos que la estimulación de la vía de RANK, que es esencial para la maduración del epitelio medular, mediante anticuerpos agonistas recuperaba las proporciones de mTECs maduras ($\text{CD40}^{\text{hi}} \text{CD80}^+$; $\text{MHCII}^{\text{hi}} \text{UEA1}^{\text{hi}}$) en FTOCs alinfoides tanto de ratones deficientes en EphB como en WT.

Conclusiones

1) EphB2 y EphB3 son moléculas necesarias para el desarrollo tímico, provocando su ausencia profundas alteraciones en el epitelio tímico y, en menor medida, del componente linfóide. **2)** Tales alteraciones afectan la celularidad del órgano, el grado de proliferación y muerte celular, y la maduración celular, y produce cambios en la morfología y organización epitelial. **3)** Los fenotipos encontrados en ausencia de una u otra molécula muestran cierto grado de especificidad, que permiten asumir que su papel en los procesos estudiados no es redundante. Así, EphB2, más que EphB3, parece estar implicada en la diferenciación linfóide y en el desarrollo del epitelio medular tímico, mientras que EphB3 lo estaría en el desarrollo del epitelio cortical. **4)** Por otro lado, la recuperación de la señal *reverse* de EphB2, en timos EphB2LacZ, mejora algunos aspectos del fenotipo observado en los timos deficientes en EphB2, poniendo de manifiesto su importancia, pero sin recuperar el fenotipo WT, lo que incide en la relevancia de la señal *forward* de EphB2 para el desarrollo tímico. **5)** La falta de señalización mediada por EphB2 o EphB3 entre timocitos y TECs en los timos mutantes afecta la señalización de otras vías como la de RANK/RANKL, capital para la maduración del epitelio medular, contribuyendo a su retraso.



SUMMARY

The role of EphB2 and EphB3 receptors in early thymic development

Introduction

The thymus is a primary lymphoid organ concerned with the functional development of immunocompetent T cells. It consists, principally, of two cellular components: the thymic epithelium (TEC) and the lymphoid cells, whose progenitor cells colonize the thymic primordium around E11.5 (*Gordon et al., 2004*). Both components organize in the thymus two histological and functionally different areas, named cortex and medulla, in which positive and negative selection respectively, of the antigen receptors of developing thymocytes occurs. Both processes are key for reaching the immune functionality (*Blackburn y Manley, 2004*).

The maturation of the two thymic components, epithelium and thymocytes, implies cell-to-cell interactions. Our own previous studies had demonstrated the relevance of tyrosine kinase receptors Eph and their ligands, the ephrins; concretely, of EphB2 and EphB3 in that process. Our studies associate these molecules with many of the functional events occurring in the thymus (*Garcia-Ceca et al., 2015*), but they do not determine when this involvement appears during ontogeny neither the concrete cell types and molecules involved. Remarkably, the lack of EphB2 or EphB3 results in hypoplastic thymuses (*Alfaro et al., 2008*) exhibiting important alterations of the epithelial cell network that appear early in ontogeny (*Garcia-Ceca et al., 2009a*) and a less severe lymphoid phenotype (*Alfaro et al., 2008*).

Objectives and Results

In the present study, we will further characterize the thymic phenotypes previously observed in EphB2- or EphB3-deficient mice, with special emphasis in the analysis of thymic epithelial component, as well as in determining the origin of such phenotype alterations. Furthermore, we will determine, by studying the thymus of EphB2LacZ mice, the relevance of EphB2-mediated *forward* and *reverse* signals in the thymic development. In summary, our study will be focused on the four more representative features of EphB2- or EphB3-deficient thymuses:

- 1) Their low cell content affecting both lymphoid and epithelial cell elements never quantified previously.
- 2) The alterations in the appearance, survival, proliferation and maturation of the different types of TECs, which result in profound phenotypic changes in the EphB-deficient adult thymuses.
- 3) The relevance of cell-to-cell interactions and EphB2- or EphB3-mediated signals established between thymocytes and TECs for the observed mutant thymic epithelial phenotypes.
- 4) The specificity of the found phenotypes in EphB2-/- and EphB3-/- thymuses reflected in the different morphology and development of their TECs.

Our current results confirm the thymic hypocellularity from E13.5 onward in the mutant mice, affecting both the CD45⁺ lymphoid cells and EpCAM⁺CD45⁻ TECs. At E12.5, the proportions of CD45⁺ lymphoid progenitors is also lower in EphB-deficient thymuses than in WT ones, due to their decreased capacity to colonize the primordium associated to the defective production of chemokines, CCL21, CCL25 and CXCL12, by the mutant thymic epithelium, and their reduced proliferative rate after colonization. The differences in the numbers of thymic cells between WT and mutant thymuses are huge from E14.5, when the T-TECs interactions are well established and the lack of Eph/ephrin-B-mediated signalling affects presumably other key signalling pathways for lymphoid proliferation and differentiation (IL7/IL7R, Dll4/Notch1 and TcR β selection), resulting in accumulation of DN1 and DN2 cells and reduced proportions of DN3 cells in the mutant thymuses, especially in the EphB2-/- ones.

Mutant TECs also exhibit early delayed maturation related with that observed in the thymocytes subsets. Thus, low numbers of colonizing lymphoid progenitor cells correlate with reduced percentages of immature MTS20⁺ TECs in the E12.5 mutant thymuses. Later, these cells accumulate and according the MTS20⁻ cells proportion reduce. This relevance of T-TECs interactions for TEC maturation was confirmed *in vitro* experiments. Remarkably, E13.5 alymphoid thymic lobes accumulate immature MTS20⁺ TECs, suggesting that thymocytes affect the early maturation of epithelial cells. Nevertheless, these studies also demonstrate the importance of Eph/ephrin-B-mediated TEC-TEC interactions for this process.

In all mutant thymuses, there is a delayed maturation of the TEC subpopulations of both cortex and medulla, defined by the expression of Ly51 and UEA1 cell markers. Delayed appearance of Ly51 expression is observed from E13.5 and of UEA1 from E17.5. In addition, this delay was confirmed by using other cortical (CD205, MHCII, $\beta 5t$ and CD40) and medullary cell markers (MHCII, CD40, CD80 and AIRE). More importantly, our results demonstrate that both EphB2 and EphB3 are molecules necessary for the adequate development of thymic epithelium, but EphB3 seems to be particularly involved in cortical epithelium development, and EphB2 in that of the medulla. On the other hand, the existence of EphB2-mediated *reverse* signals improves, but does not recover totally, the condition of EphB2LacZ epithelium. The delayed maturation of EphB-deficient thymic epithelium was confirmed using new cell markers. Thus, MTS20^{hi}Cld3,4^{hi} and Cld3,4^{hi}SSEA1⁺ cells accumulated in the fetal mutant thymuses, and a lower number of Cld3,4^{hi} TECs occurred in postnatal ones, whereas increased percentages of $\alpha 6^{\text{hi}}$ Sca-1^{hi} cells appeared in E17.5 EphB2^{-/-} thymuses.

Apart from the delayed maturation of both lymphoid and epithelial cell subpopulations, EphB-deficient thymuses show higher proportions of apoptotic thymocytes and TECs from E13.5 onward. At E12.5 the delayed epithelial maturation does not allow that the mutant TECs receive apoptotic signals, remaining unchanged their values respect to those of WT ones. The profile of TEC proliferation is similar in WT and mutant thymuses from the earliest stages of development (E12.5-E13.5) onward, but the proportions of cycling cells were lower in the mutant thymuses. Accordingly, the decreased proportions of cycling MTS20⁺ cells contribute significantly to the thymic hypocellularity, especially in the earliest stages, and those of cycling MTS20⁻ cells from E13.5-E14.5 onward. Thus, until E14.5-E15.5 the main cycling TECs were Ly51⁻UEA1⁻ and Ly51⁺UEA1⁻ cells that must contribute importantly to the reduced cellularity of mutant thymuses, because in these development stages WT thymic cortex expands significantly. On the other hand, these alterations of the cycle of mutant TECs correlate with a reduced signalling through FGFR2IIIb, a signalling pathway known to be involved in the epithelial proliferation.

Different experimental approaches confirmed that thymic alterations occurring in the EphB-deficient thymuses were due to lack of these tyrosine kinases receptors. *In vitro*,

the blockade of Eph/ephrin-B signalling by soluble fusion proteins in E13.5 WT fetal thymic lobes courses, as found in mutant thymuses, with hypocellularity, accumulation of MTS20⁺ cells and reduce proportions of MTS20⁻ cells. *In vivo*, grafted thymic stroma and/or lymphoid progenitors from WT and/or mutant mice evolved similarly to *in situ* of EphB-deficient thymuses. In these studies, we confirmed that EphB2-mediated *forward* signal is more relevant than that mediated through EphB3 for controlling thymic cell content; and any *forward* signal transmitted through EphB2 or EphB3 plus any *reverse* signal direct the epithelial differentiation to medullary epithelium, with a greater relevance of the EphB2 signals than those mediated by EphB3. However, in these experiments it was not impossible to clearly demonstrate the relevance of EphB3 signalling for governing cortical epithelium development, as suggesting the found *in situ* results.

Furthermore, other experiments suggested newly that thymocytes-TECs interactions and the role played in them by Eph/ephrins-B were remarkably essential for explaining the observed phenotypes when the signals transmitted by these molecules are lacking. Firstly, as above mentioned, the lack of thymocytes courses with delayed epithelial maturation. Moreover, EphB-deficient thymuses yield less nurse complex, especially of those more frequently produced. On the other hand, all studied EphB and ephrin-B are expressed in both thymocytes and TEC, but the proportions of expressing thymocytes are lower than those of positive TECs, a finding that could explain the weak effects observed in these cells as compared to those exerted on TECs. Similarly, a higher numbers of thymocytes express EphB2 than EphB3, that could explain the more severe lymphoid phenotype and the lower numbers of thymocytes observed in the EphB2^{-/-} thymuses respect to those of EphB3^{-/-} ones. Finally, there was a remarkable correlation between the altered proportions of both Ly51⁻UEA1⁻ and Ly51⁺UEA1⁻ cell subsets of E12.5 and E13.5 mutant thymuses and the higher expression of both EphB and ephrin-B2 in them.

Because the lack of Eph affected thymocytes-TECs interactions as shown by the morphological changes of mutant thymic epithelium, high number of apoptotic thymocytes and TECs, and decreased proportions of some thymic lymphoid subpopulations, such as V γ 5⁺RANKL⁺ cells, involved in the maturation of medullary TECs, we analysed whether an additional stimulation of certain signalling pathways

established between thymocytes and TECs, and, therefore, prevented partially in the mutant thymuses, could rescue total or partially the mutant phenotype. Thus, we evidenced that the stimulation of RANK pathway, key in the medullary epithelium maturation, by agonistic antibodies recovered WT proportions of mature mTECs (CD40^{hi}CD80⁺; MHCII^{hi}UEA1^{hi}) in alymphoid FTOCs established from WT, but also mutant mice.

Conclusions

1) EphB2 and EphB3 are molecules necessary for the thymic development, and their lack causes profound alterations in thymic epithelium, and in a lesser degree, in the lymphoid component. **2)** These alterations affect: the thymic cellularity, the cell survival and proliferation, and the cellular maturation, as well as the morphology and organization of thymic epithelium. **3)** Observed phenotypes in mutant thymuses indicate specificity, rather than redundancy of the effects provoked by the lack of each studied EphB. Thus, EphB2, rather than EphB3, seems to be especially involved in the lymphoid maturation and the development of medullary thymic epithelium, whereas EphB3 further governs the cortical epithelial development. **4)** The existence of an EphB2-mediated *reverse* signal, improves partially the phenotype found in EphB2^{-/-} thymuses, but does not recover totally the WT phenotype, emphasizing the relevance of *forward* signals mediated by EphB2 for the thymus development. **5)** The lack of signalling mediated by either EphB2 or EphB3 in mutant thymocytes and/or TECs, affects other signalling pathways, such as that mediate by RANK/RANKL key for the maturation of medullary epithelium, contributing to its delay.



BIBLIOGRAFÍA

Aasheim, H.C., Delabie, J. y Finne, E.F. (2005). Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood* **105**, 2869-76.

Aigner, A., Malerczyk, C., Houghtling, R. y Wellstein, A. (2000). Tissue distribution and retinoid-mediated downregulation of an FGF-binding protein (FGF-BP) in the rat. *Growth Factors* **18**, 51-62.

Akiyama, T., Maeda, S., Yamane, S., Ogino, K., Kasai, M., Kajiura, F., Matsumoto, M. y Inoue, J. (2005). Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma. *Science* **308**, 248-51.

Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y. y Inoue, J. (2008). The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* **29**, 423-37.

Alexandropoulos, K. y Danzl, N.M. (2012). Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. *Immunol Res* **54**, 177-90.

Alfaro, D., Garcia-Ceca, J.J., Cejalvo, T., Jimenez, E., Jenkinson, E.J., Anderson, G., Munoz, J.J. y Zapata, A. (2007). EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur J Immunol* **37**, 2596-605.

Alfaro, D., Munoz, J.J., Garcia-Ceca, J., Cejalvo, T., Jimenez, E. y Zapata, A. (2008). Alterations in the thymocyte phenotype of EphB-deficient mice largely affect the double negative cell compartment. *Immunology* **125**, 131-43.

Alfaro, D., Munoz, J.J., Garcia-Ceca, J., Cejalvo, T., Jimenez, E. y Zapata, A.G. (2011). The Eph/ephrinB signal balance determines the pattern of T-cell maturation in the thymus. *Immunol Cell Biol* **89**, 844-52.

Alfaro, D., Garcia-Ceca, J., Farias-de-Oliveira, D.A., Terra-Granado, E., Montero-Herradon, S., Cotta-de-Almeida, V., Savino, W. y Zapata, A. (2015). EphB2 and EphB3 play an important role in the lymphoid seeding of murine adult thymus. *J Leukoc Biol* **98**, 883-96.

Aliahmad, P. y Kaye, J. (2006). Commitment issues: linking positive selection signals and lineage diversification in the thymus. *Immunol Rev* **209**, 253-73.

Alves, N.L., Richard-Le Goff, O., Huntington, N.D., Sousa, A.P., Ribeiro, V.S., Bordack, A., Vives, F.L., Peduto, L., Chidgey, A., Cumano, A., Boyd, R., Eberl, G. y Di Santo, J.P. (2009). Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1512-7.

Alves, N.L., Huntington, N.D., Mention, J.J., Richard-Le Goff, O. y Di Santo, J.P. (2010). Cutting Edge: a thymocyte-thymic epithelial cell cross-talk dynamically regulates intrathymic IL-7 expression in vivo. *J Immunol* **184**, 5949-53.

Alves, N.L., Takahama, Y., Ohigashi, I., Ribeiro, A.R., Baik, S., Anderson, G. y Jenkinson, W.E. (2014). Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments. *Eur J Immunol* **44**, 16-22.

Alves, N.L. y Ribeiro, A.R. (2016). Thymus medulla under construction: Time and space oddities. *Eur J Immunol* **46**, 829-33.

Anderson, G. y Jenkinson, E.J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* **1**, 31-40.

Anderson, G., Jenkinson, E.J. y Rodewald, H.R. (2009). A roadmap for thymic epithelial cell development. *Eur J Immunol* **39**, 1694-9.

Anderson, G. y Jenkinson, W.E. (2015). Border control: Anatomical origins of the thymus medulla. *Eur J Immunol* **45**, 2203-7.

Anderson, K.L., Moore, N.C., McLoughlin, D.E., Jenkinson, E.J. y Owen, J.J. (1998). Studies on thymic epithelial cells in vitro. *Dev Comp Immunol* **22**, 367-77.

Anderson, M., Anderson, S.K. y Farr, A.G. (2000). Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment? *Int Immunol* **12**, 1105-10.

Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. y Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-401.

Aoki, M., Yamashita, T. y Tohyama, M. (2004). EphA receptors direct the differentiation of mammalian neural precursor cells through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **279**, 32643-50.

Ara, T., Itoi, M., Kawabata, K., Egawa, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Fujii, N., Amagai, T. y Nagasawa, T. (2003). A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* **170**, 4649-55.

Arnold, J.S., Werling, U., Braunstein, E.M., Liao, J., Nowotschin, S., Edelmann, W., Hebert, J.M. y Morrow, B.E. (2006). Inactivation of Tbx1 in the pharyngeal endoderm results in 22q11DS malformations. *Development* **133**, 977-87.

Arthur, A., Koblar, S., Shi, S. y Gronthos, S. (2009). Eph/ephrinB mediate dental pulp stem cell mobilization and function. *J Dent Res* **88**, 829-34.

Arthur, A., Zannettino, A., Panagopoulos, R., Koblar, S.A., Sims, N.A., Stylianou, C., Matsuo, K. y Gronthos, S. (2011). EphB/ephrin-B interactions mediate human MSC attachment, migration and osteochondral differentiation. *Bone* **48**, 533-42.

Arvanitis, D. y Davy, A. (2008). Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev* **22**, 416-29.

Auerbach, R. (1960). Morphogenetic interactions in the development of the mouse thymus gland. *Dev Biol* **2**, 271-84.

Baik, S., Jenkinson, E.J., Lane, P.J., Anderson, G. y Jenkinson, W.E. (2013). Generation of both cortical and Aire(+) medullary thymic epithelial compartments from CD205(+) progenitors. *Eur J Immunol* **43**, 589-94.

Baik, S., Sekai, M., Hamazaki, Y., Jenkinson, W.E. y Anderson, G. (2016). Relb acts downstream of medullary thymic epithelial stem cells and is essential for the emergence of RANK(+) medullary epithelial progenitors. *Eur J Immunol* **46**, 857-62.

Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Hess, I., Rode, I., Netuschil, N., Tay, B.H., Venkatesh, B., Yu, J.K., Kaltenbach, S.L., Holland, N.D., Diekhoff, D., Happe, C., Schorpp, M. y Boehm, T. (2009). Evolution of genetic networks underlying the emergence of thymopoiesis in vertebrates. *Cell* **138**, 186-97.

Balciunaite, G., Keller, M.P., Balciunaite, E., Piali, L., Zuklys, S., Mathieu, Y.D., Gill, J., Boyd, R., Sussman, D.J. y Hollander, G.A. (2002). Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* **3**, 1102-8.

Barcena, A., Galy, A.H., Punnonen, J., Muench, M.O., Schols, D., Roncarolo, M.G., de Vries, J.E. y Spits, H. (1994). Lymphoid and myeloid differentiation of fetal liver CD34+lineage- cells in human thymic organ culture. *J Exp Med* **180**, 123-32.

Barthlott, T., Keller, M.P., Krenger, W. y Hollander, G.A. (2006). A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. *Swiss Med Wkly* **136**, 365-9.

Bennett, A.R., Farley, A., Blair, N.F., Gordon, J., Sharp, L. y Blackburn, C.C. (2002). Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. *Immunity* **16**, 803-14.

Benz, C., Heinzl, K. y Bleul, C.C. (2004). Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur J Immunol* **34**, 3652-63.

Berent-Maoz, B., Montecino-Rodriguez, E., Signer, R.A. y Dorshkind, K. (2012). Fibroblast growth factor-7 partially reverses murine thymocyte progenitor aging by repression of Ink4a. *Blood* **119**, 5715-21.

Beverly, L.J., Ascano, J.M. y Capobianco, A.J. (2006). Expression of JAGGED1 in T-lymphocytes results in thymic involution by inducing apoptosis of thymic stromal epithelial cells. *Genes Immun* **7**, 476-86.

Birgbauer, E., Cowan, C.A., Sretavan, D.W. y Henkemeyer, M. (2000). Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development* **127**, 1231-41.

Blackburn, C.C., Augustine, C.L., Li, R., Harvey, R.P., Malin, M.A., Boyd, R.L., Miller, J.F. y Morahan, G. (1996). The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5742-6.

Blackburn, C.C. y Manley, N.R. (2004). Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* **4**, 278-89.

Bleul, C.C. y Boehm, T. (2000). Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol* **30**, 3371-9.

Bleul, C.C. y Boehm, T. (2005). BMP signaling is required for normal thymus development. *J Immunol* **175**, 5213-21.

Bleul, C.C., Corbeaux, T., Reuter, A., Fisch, P., Monting, J.S. y Boehm, T. (2006). Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* **441**, 992-6.

Bockman, D.E. y Kirby, M.L. (1984). Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science* **223**, 498-500.

Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K. y Bleul, C.C. (2003). Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med* **198**, 757-69.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C. y Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* **196**, 1627-38.

Bredenkamp, N., Ulyanchenko, S., O'Neill, K.E., Manley, N.R., Vaidya, H.J. y Blackburn, C.C. (2014). An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat Cell Biol* **16**, 902-8.

Brelinska, R., Kaczmarek, E. y Ostalska, D. (2001). Kinetics of thymic stroma development in the foetal period. *Folia Histochem Cytobiol* **39**, 195-6.

Brissette, J.L., Li, J., Kamimura, J., Lee, D. y Dotto, G.P. (1996). The product of the mouse nude locus, Whn, regulates the balance between epithelial cell growth and differentiation. *Genes Dev* **10**, 2212-21.

Buono, M., Facchini, R., Matsuoka, S., Thongjuea, S., Waithe, D., Luis, T.C., Giustacchini, A., Besmer, P., Mead, A.J., Jacobsen, S.E. y Nerlov, C. (2016). A dynamic niche provides Kit ligand in a stage-specific manner to the earliest thymocyte progenitors. *Nat Cell Biol* **18**, 157-67.

Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L.A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R. y Lo, D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* **373**, 531-6.

Calderon, L. y Boehm, T. (2011). Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7517-22.

Candi, E., Rufini, A., Terrinoni, A., Giamboi-Miraglia, A., Lena, A.M., Mantovani, R., Knight, R. y Melino, G. (2007). DeltaNp63 regulates thymic development through enhanced expression of FgfR2 and Jag2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11999-2004.

Carleton, M., Haks, M.C., Smeele, S.A., Jones, A., Belkowski, S.M., Berger, M.A., Linsley, P., Kruisbeek, A.M. y Wiest, D.L. (2002). Early growth response transcription factors are required for development of CD4(-)CD8(-) thymocytes to the CD4(+)CD8(+) stage. *J Immunol* **168**, 1649-58.

Ceredig, R. y Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* **2**, 888-97.

Ceredig, R. y Rolink, A.G. (2012). The key role of IL-7 in lymphopoiesis. *Semin Immunol* **24**, 159-64.

Cejalvo, T. (2011). Tesis doctoral: Papel de ephrina B1 y ephrina B2 en el desarrollo y la función del timo. Universidad Complutense de Madrid.

Cejalvo, T., Munoz, J.J., Tobajas, E., Fanlo, L., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J. y Zapata, A. (2013). Ephrin-B-dependent thymic epithelial cell-thymocyte interactions are necessary for correct T cell differentiation and thymus histology organization: relevance for thymic cortex development. *J Immunol* **190**, 2670-81.

Cejalvo, T., Munoz, J.J., Tobajas, E., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J. y Zapata, A. (2015). Conditioned deletion of ephrinB1 and/or ephrinB2 in either thymocytes or thymic epithelial cells alters the organization of thymic medulla and favors the appearance of thymic epithelial cysts. *Histochem Cell Biol* **143**, 517-29.

Clark, R.A., Yamanaka, K., Bai, M., Dowgiert, R. y Kupper, T.S. (2005). Human skin cells support thymus-independent T cell development. *J Clin Invest* **115**, 3239-49.

Coles, M.C., Adams, R., Adams, S., Roderick, K., Norton, T., Wilkinson, D. y Kioussis, D. (2004). The Role of Eph Receptors and Ephrin Ligands in T Cell Development in the Thymus. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, July 18-23.

Cook, A.M. (2010). PhD Thesis: Proliferation and lineage potential in fetal thymic epithelial progenitor cells. The University of Edinburgh.

Corbeaux, T., Hess, I., Swann, J.B., Kanzler, B., Haas-Assenbaum, A. y Boehm, T. (2010). Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16613-8.

Cordier, A.C. y Heremans, J.F. (1975). Nude mouse embryo: ectodermal nature of the primordial thymic defect. *Scand J Immunol* **4**, 193-6.

Cowan, C.A. y Henkemeyer, M. (2001). The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* **413**, 174-9.

Chen, L., Xiao, S. y Manley, N.R. (2009). Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* **113**, 567-74.

Cheng, L., Guo, J., Sun, L., Fu, J., Barnes, P.F., Metzger, D., Chambon, P., Oshima, R.G., Amagai, T. y Su, D.M. (2010). Postnatal Tissue-specific Disruption of Transcription Factor FoxN1 Triggers Acute Thymic Atrophy*. *J Biol Chem* **285**, 5836-47.

Chidgey, A.P. y Boyd, R.L. (2006). Stemming the tide of thymic aging. *Nat Immunol* **7**, 1013-6.

Chilukuri, R.V., Patel, V.K., Martinez, M., Guyden, J.C. y Samms, M.D. (2014). The Antigenic Determinant That Defines Thymic Nurse Cells Is Expressed by Thymic Epithelial Progenitor Cells. *Front Cell Dev Biol* **2**, 1-13.

Chin, R.K., Lo, J.C., Kim, O., Blink, S.E., Christiansen, P.A., Peterson, P., Wang, Y., Ware, C. y Fu, Y.X. (2003). Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression. *Nat Immunol* **4**, 1121-7.

Chin, R.K., Zhu, M., Christiansen, P.A., Liu, W., Ware, C., Peltonen, L., Zhang, X., Guo, L., Han, S., Zheng, B. y Fu, Y.X. (2006). Lymphotoxin pathway-directed, autoimmune regulator-independent central tolerance to arthritogenic collagen. *J Immunol* **177**, 290-7.

Choi, Y.I., Duke-Cohan, J.S., Tan, J., Gui, J., Singh, M.K., Epstein, J.A. y Reinherz, E.L. (2013). Plxnd1 expression in thymocytes regulates their intrathymic migration while that in thymic endothelium impacts medullary topology. *Front Immunol* **4**, 392.

Chumley, M.J., Catchpole, T., Silvany, R.E., Kernie, S.G. y Henkemeyer, M. (2007). EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* **27**, 13481-90.

Danzl, N.M., Donlin, L.T. y Alexandropoulos, K. (2010). Regulation of medullary thymic epithelial cell differentiation and function by the signaling protein Sin. *J Exp Med* **207**, 999-1013.

Danzl, N.M., Jeong, S., Choi, Y. y Alexandropoulos, K. (2014). Identification of novel thymic epithelial cell subsets whose differentiation is regulated by RANKL and Traf6. *PLoS One* **9**, e86129.

Darnell, J.E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-5.

Davy, A. y Soriano, P. (2005). Ephrin signaling in vivo: look both ways. *Dev Dyn* **232**, 1-10.

De Moerlooze, L., Spencer-Dene, B., Revest, J.M., Hajihosseini, M., Rosewell, I. y Dickson, C. (2000). An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* **127**, 483-92.

de Saint-Vis, B., Bouchet, C., Gautier, G., Valladeau, J., Caux, C. y Garrone, P. (2003). Human dendritic cells express neuronal Eph receptor tyrosine kinases: role of EphA2 in regulating adhesion to fibronectin. *Blood* **102**, 4431-40.

Depaepe, V., Suarez-Gonzalez, N., Dufour, A., Passante, L., Gorski, J.A., Jones, K.R., Ledent, C. y Vanderhaeghen, P. (2005). Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* **435**, 1244-50.

Depreter, M.G., Blair, N.F., Gaskell, T.L., Nowell, C.S., Davern, K., Pagliocca, A., Stenhouse, F.H., Farley, A.M., Fraser, A., Vrana, J., Robertson, K., Morahan, G., Tomlinson, S.R. y Blackburn, C.C. (2008). Identification of Plet-1 as a specific marker of early thymic epithelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 961-6.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. y Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* **2**, 1032-9.

Derbinski, J., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhausen, M., Peltonen, L., Walter, J. y Kyewski, B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* **202**, 33-45.

Derbinski, J., Pinto, S., Rosch, S., Hexel, K. y Kyewski, B. (2008). Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 657-62.

Desanti, G.E., Jenkinson, W.E., Parnell, S.M., Boudil, A., Gautreau-Rolland, L., Eksteen, B., Ezine, S., Lane, P.J., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2011). Clonal analysis reveals uniformity in the molecular profile and lineage potential of CCR9(+) and CCR9(-) thymus-settling progenitors. *J Immunol* **186**, 5227-35.

Dietrich, S. y Gruss, P. (1995). undulated Phenotypes suggest a role of Pax-1 for the development of vertebral and extravertebral structures. *Dev Biol* **167**, 529-48.

Dohn, M., Jiang, J. y Chen, X. (2001). Receptor tyrosine kinase EphA2 is regulated by p53-family proteins and induces apoptosis. *Oncogene* **20**, 6503-15.

Dooley, J., Erickson, M. y Farr, A.G. (2005). An organized medullary epithelial structure in the normal thymus expresses molecules of respiratory epithelium and resembles the epithelial thymic rudiment of nude mice. *J Immunol* **175**, 4331-7.

Dooley, J., Erickson, M., Larochelle, W.J., Gillard, G.O. y Farr, A.G. (2007). FGFR2IIIb signaling regulates thymic epithelial differentiation. *Dev Dyn* **236**, 3459-71.

Dooley, J., Erickson, M. y Farr, A.G. (2008). Alterations of the medullary epithelial compartment in the Aire-deficient thymus: implications for programs of thymic epithelial differentiation. *J Immunol* **181**, 5225-32.

Dooley, J., Erickson, M. y Farr, A.G. (2009). Lessons from thymic epithelial heterogeneity: FoxN1 and tissue-restricted gene expression by extrathymic, endodermally derived epithelium. *J Immunol* **183**, 5042-9.

Dorshkind, K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* **8**, 111-37.

Douagi, I., Vieira, P. y Cumano, A. (2002). Lymphocyte commitment during embryonic development, in the mouse. *Semin Immunol* **14**, 361-9.

Dumont-Lagace, M., Brochu, S., St-Pierre, C. y Perreault, C. (2014). Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *J Immunol* **192**, 2219-26.

Erb, K.J., Hanke, T., Schimpl, A., Hünig, T., Stingl, G. y Elbe, A. (1995). Impaired survival of T cell receptor V γ 3⁺ cells in interleukin-4 transgenic mice. *Eur J Immunol* **25**, 1442-45.

Erickson, M., Morkowski, S., Lehar, S., Gillard, G., Beers, C., Dooley, J., Rubin, J.S., Rudensky, A. y Farr, A.G. (2002). Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood* **100**, 3269-78.

Farley, A.M., Morris, L.X., Vroegindeweij, E., Depreter, M.L., Vaidya, H., Stenhouse, F.H., Tomlinson, S.R., Anderson, R.A., Cupedo, T., Cornelissen, J.J. y Blackburn, C.C. (2013). Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development. *Development* **140**, 2015-26.

Farr, A., Nelson, A. y Hosier, S. (1992). Characterization of an antigenic determinant preferentially expressed by type I epithelial cells in the murine thymus. *J Histochem Cytochem* **40**, 651-64.

Farr, A.G., Dooley, J.L. y Erickson, M. (2002). Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation. *Immunol Rev* **189**, 20-7.

Fiorini, E., Ferrero, I., Merck, E., Favre, S., Pierres, M., Luther, S.A. y MacDonald, H.R. (2008). Cutting edge: thymic crosstalk regulates delta-like 4 expression on cortical epithelial cells. *J Immunol* **181**, 8199-203.

Foo, S.S., Turner, C.J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha, D. y Adams, R.H. (2006). Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* **124**, 161-73.

Foster, K., Sheridan, J., Veiga-Fernandes, H., Roderick, K., Pachnis, V., Adams, R., Blackburn, C., Kioussis, D. y Coles, M. (2008). Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus. *J Immunol* **180**, 3183-9.

Foster, K.E., Gordon, J., Cardenas, K., Veiga-Fernandes, H., Makinen, T., Grigorieva, E., Wilkinson, D.G., Blackburn, C.C., Richie, E., Manley, N.R., Adams, R.H., Kioussis, D. y Coles, M.C. (2010). EphB-ephrin-B2 interactions are required for thymus migration during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13414-9.

Frank, D.U., Fotheringham, L.K., Brewer, J.A., Muglia, L.J., Tristani-Firouzi, M., Capecchi, M.R. y Moon, A.M. (2002). An Fgf8 mouse mutant phenocopies human 22q11 deletion syndrome. *Development* **129**, 4591-603.

Freywald, A., Sharfe, N., Rashotte, C., Grunberger, T. y Roifman, C.M. (2003). The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses. *J Biol Chem* **278**, 10150-6.

Freywald, A., Sharfe, N., Miller, C.D., Rashotte, C. y Roifman, C.M. (2006). EphA receptors inhibit anti-CD3-induced apoptosis in thymocytes. *J Immunol* **176**, 4066-74.

Gabler, J., Arnold, J. y Kyewski, B. (2007). Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* **37**, 3363-72.

Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D.G., Pawson, T., Davis, S. y Yancopoulos, G.D. (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* **17**, 9-19.

Gameiro, J., Nagib, P. y Verinaud, L. (2010). The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adh Migr* **4**, 382-90.

Gao, P.P., Sun, C.H., Zhou, X.F., DiCicco-Bloom, E. y Zhou, R. (2000). Ephrins stimulate or inhibit neurite outgrowth and survival as a function of neuronal cell type. *J Neurosci Res* **60**, 427-36.

Garcia-Ceca, J., Jimenez, E., Alfaro, D., Cejalvo, T., Chumley, M.J., Henkemeyer, M., Munoz, J.J. y Zapata, A.G. (2009a). On the role of Eph signalling in thymus histogenesis; EphB2/B3 and the organizing of the thymic epithelial network. *Int J Dev Biol* **53**, 971-82.

Garcia-Ceca, J., Jimenez, E., Alfaro, D., Cejalvo, T., Munoz, J.J. y Zapata, A.G. (2009b). Cell-autonomous role of EphB2 and EphB3 receptors in the thymic epithelial cell organization. *Eur J Immunol* **39**, 2916-24.

Garcia-Ceca, J., Alfaro, D., Montero-Herradon, S. y Zapata, A.G. (2013). Eph/ephrinB signalling is involved in the survival of thymic epithelial cells. *Immunol Cell Biol* **91**, 130-8.

Garcia-Ceca, J., Alfaro, D., Montero-Herradon, S., Tobajas, E., Munoz, J.J. y Zapata, A.G. (2015). Eph/Ephrins-Mediated Thymocyte-Thymic Epithelial Cell Interactions Control Numerous Processes of Thymus Biology. *Front Immunol* **6**, Art. 333.

Gardiner, J.R., Jackson, A.L., Gordon, J., Lickert, H., Manley, N.R. y Basson, M.A. (2012). Localised inhibition of FGF signalling in the third pharyngeal pouch is required for normal thymus and parathyroid organogenesis. *Development* **139**, 3456-66.

Ge, Q. y Zhao, Y. (2013). Evolution of thymus organogenesis. *Dev Comp Immunol* **39**, 85-90.

Gill, J., Malin, M., Hollander, G.A. y Boyd, R. (2002). Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells. *Nat Immunol* **3**, 635-42.

Gillard, G.O. y Farr, A.G. (2005). Contrasting models of promiscuous gene expression by thymic epithelium. *J Exp Med* **202**, 15-9.

Gillard, G.O., Dooley, J., Erickson, M., Peltonen, L. y Farr, A.G. (2007). Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *J Immunol* **178**, 3007-15.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T. y Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* **150**, 4244-52.

Gommeaux, J., Gregoire, C., Nguessan, P., Richelme, M., Malissen, M., Guerder, S., Malissen, B. y Carrier, A. (2009). Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes. *Eur J Immunol* **39**, 956-64.

Gordon, J., Wilson, V.A., Blair, N.F., Sheridan, J., Farley, A., Wilson, L., Manley, N.R. y Blackburn, C.C. (2004). Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol* **5**, 546-53.

Gordon, J., Wilson, V.A., Moore-Scott, B.A., Manley, N.R. y Blackburn, C.C. (2005). In vivo and in vitro assays of thymic organogenesis. *Methods Mol Med* **105**, 303-10.

Gordon, J., Patel, S.R., Mishina, Y. y Manley, N.R. (2010). Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis. *Dev Biol* **339**, 141-54.

Gordon, J. y Manley, N.R. (2011). Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* **138**, 3865-78.

Gossens, K., Naus, S., Corbel, S.Y., Lin, S., Rossi, F.M., Kast, J. y Ziltener, H.J. (2009). Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J Exp Med* **206**, 761-78.

Gray, D., Abramson, J., Benoist, C. y Mathis, D. (2007). Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med* **204**, 2521-8.

Gray, D.H., Chidgey, A.P. y Boyd, R.L. (2002). Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods* **260**, 15-28.

Gray, D.H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M.K., Liston, A., Lew, A.M., Goodnow, C.C. y Boyd, R.L. (2006). Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* **108**, 3777-85.

Grevellec, A. y Tucker, A.S. (2010). The pharyngeal pouches and clefts: Development, evolution, structure and derivatives. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 325-32.

Griffith, A.V., Cardenas, K., Carter, C., Gordon, J., Iberg, A., Engleka, K., Epstein, J.A., Manley, N.R. y Richie, E.R. (2009). Increased thymus- and decreased parathyroid-fated organ domains in Splotch mutant embryos. *Dev Biol* **327**, 216-27.

Groeger, G. y Nobes, C.D. (2007). Co-operative Cdc42 and Rho signalling mediates ephrinB-triggered endothelial cell retraction. *Biochem J* **404**, 23-9.

Guo, J., Rahman, M., Cheng, L., Zhang, S., Tvinnereim, A. y Su, D.M. (2011). Morphogenesis and maintenance of the 3D thymic medulla and prevention of nude skin phenotype require FoxN1 in pre- and post-natal K14 epithelium. *J Mol Med (Berl)* **89**, 263-77.

Hale, L.P. y Markert, M.L. (2004). Corticosteroids regulate epithelial cell differentiation and Hassall body formation in the human thymus. *J Immunol* **172**, 617-24.

- Hamazaki, Y., Fujita, H., Kobayashi, T., Choi, Y., Scott, H.S., Matsumoto, M. y Minato, N.** (2007). Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nat Immunol* **8**, 304-11.
- Hanissian, S.H. y Geha, R.S.** (1997). Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* **6**, 379-87.
- Harman, B.C., Jenkinson, E.J. y Anderson, G.** (2003). Entry into the thymic microenvironment triggers Notch activation in the earliest migrant T cell progenitors. *J Immunol* **170**, 1299-303.
- Hauri-Hohl, M.M., Zuklys, S., Keller, M.P., Jeker, L.T., Barthlott, T., Moon, A.M., Roes, J. y Hollander, G.A.** (2008). TGF-beta signaling in thymic epithelial cells regulates thymic involution and postirradiation reconstitution. *Blood* **112**, 626-34.
- Hayashi, R., Yamato, M., Saito, T., Oshima, T., Okano, T., Tano, Y. y Nishida, K.** (2008). Enrichment of corneal epithelial stem/progenitor cells using cell surface markers, integrin alpha6 and CD71. *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 256-63.
- Heinonen, K.M., Vanegas, J.R., Brochu, S., Shan, J., Vainio, S.J. y Perreault, C.** (2011a). Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors. *Blood* **118**, 5163-73.
- Heinonen, K.M., Vanegas, J.R., Lew, D., Krosi, J. y Perreault, C.** (2011b). Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS One* **6**, e19279.
- Heinzel, K., Benz, C. y Bleul, C.C.** (2007). A silent chemokine receptor regulates steady-state leukocyte homing in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8421-6.
- Hendrix, T.M., Chilukuri, R.V., Martinez, M., Olushoga, Z., Blake, A., Brohi, M., Walker, C., Samms, M. y Guyden, J.C.** (2010). Thymic nurse cells exhibit epithelial progenitor phenotype and create unique extra-cytoplasmic membrane space for thymocyte selection. *Cell Immunol* **261**, 81-92.

Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J.T., Saxton, T.M., Roder, J., Pawson, T. y Klein, R. (1996). Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* **86**, 35-46.

Henkemeyer, M., Itkis, O.S., Ngo, M., Hickmott, P.W. y Ethell, I.M. (2003). Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol* **163**, 1313-26.

Hetzer-Egger, C., Schorpp, M., Haas-Assenbaum, A., Balling, R., Peters, H. y Boehm, T. (2002). Thymopoiesis requires Pax9 function in thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* **32**, 1175-81.

Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J., Akiyama, T. y Takahama, Y. (2008). The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity* **29**, 438-50.

Himanen, J.P. y Nikolov, D.B. (2003). Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci* **26**, 46-51.

Himanen, J.P., Chumley, M.J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W.A., Jeffrey, P.D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D.A., Boyd, A.W., Henkemeyer, M. y Nikolov, D.B. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* **7**, 501-9.

Hirano, K., Negishi, N., Yazawa, M., Yagita, H., Habu, S. y Hozumi, K. (2015). Delta-like 4-mediated Notch signaling is required for early T-cell development in a three-dimensional thymic structure. *Eur J Immunol* **45**, 2252-62.

Hirano, T., Ishihara, K. y Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19**, 2548-56.

Hirayama, T., Asano, Y., Iida, H., Watanabe, T., Nakamura, T. y Goitsuka, R. (2014). Meis1 is required for the maintenance of postnatal thymic epithelial cells. *PLoS One* **9**, e89885.

Hjorthaug, H.S. y Aasheim, H.C. (2007). Ephrin-A1 stimulates migration of CD8+CCR7+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* **37**, 2326-36.

Holmberg, J., Genander, M., Halford, M.M., Anneren, C., Sondell, M., Chumley, M.J., Silvany, R.E., Henkemeyer, M. y Frisen, J. (2006). EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* **125**, 1151-63.

Hollander, G.A. (2007). Claudins provide a breath of fresh Aire. *Nat Immunol* **8**, 234-6.

Hollander, G.A., Wang, B., Nichogiannopoulou, A., Platenburg, P.P., van Ewijk, W., Burakoff, S.J., Gutierrez-Ramos, J.C. y Terhorst, C. (1995). Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* **373**, 350-3.

Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S. y Owen, M.J. (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* **5**, 638-44.

Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Hollander, G.A., Shima, D.T. y Habu, S. (2008). Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* **205**, 2507-13.

Hsieh, C.Y., Nakamura, P.A., Luk, S.O., Miko, I.J., Henkemeyer, M. y Cramer, K.S. (2010). Ephrin-B reverse signaling is required for formation of strictly contralateral auditory brainstem pathways. *J Neurosci* **30**, 9840-9.

Hu, Y., Wang, X., Wu, Y., Jin, W., Cheng, B., Fang, X., Martel-Pelletier, J., Kapoor, M., Peng, J., Qi, S., Shi, G., Wu, J. y Luo, H. (2015a). Role of EFNB1 and EFNB2 in Mouse Collagen-Induced Arthritis and Human Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* **67**, 1778-88.

Hu, Z., Lancaster, J.N., Sasiponganan, C. y Ehrlich, L.I. (2015b). CCR4 promotes medullary entry and thymocyte-dendritic cell interactions required for central tolerance. *J Exp Med* **212**, 1947-65.

Hubert, F.X., Kinkel, S.A., Davey, G.M., Phipson, B., Mueller, S.N., Liston, A., Proietto, A.I., Cannon, P.Z., Forehan, S., Smyth, G.K., Wu, L., Goodnow, C.C., Carbone, F.R., Scott, H.S. y

Heath, W.R. (2011). Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* **118**, 2462-72.

Hunziker, L., Benitah, S.A., Braun, K.M., Jensen, K., McNulty, K., Butler, C., Potton, E., Nye, E., Boyd, R., Laurent, G., Glogauer, M., Wright, N.A., Watt, F.M. y Janes, S.M. (2011). Rac1 deletion causes thymic atrophy. *PLoS One* **6**, e19292.

Inada, T., Iwama, A., Sakano, S., Ohno, M., Sawada, K. y Suda, T. (1997). Selective expression of the receptor tyrosine kinase, HTK, on human erythroid progenitor cells. *Blood* **89**, 2757-65.

Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I.R., Hubert, F.X., Scott, H.S., Takahama, Y., Hollander, G.A. y Reith, W. (2008). Autoantigen-specific interactions with CD4+ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity* **29**, 451-63.

Irla, M., Guenot, J., Sealy, G., Reith, W., Imhof, B.A. y Serge, A. (2013). Three-dimensional visualization of the mouse thymus organization in health and immunodeficiency. *J Immunol* **190**, 586-96.

Itoi, M., Kawamoto, H., Katsura, Y. y Amagai, T. (2001). Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int Immunol* **13**, 1203-11.

Itoi, M., Tsukamoto, N. y Amagai, T. (2007). Expression of Dll4 and CCL25 in Foxn1-negative epithelial cells in the post-natal thymus. *Int Immunol* **19**, 127-32.

Ivanova, N.B., Dimos, J.T., Schaniel, C., Hackney, J.A., Moore, K.A. y Lemischka, I.R. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* **298**, 601-4.

Jaleco, A.C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D. y Parreira, L. (2001). Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med* **194**, 991-1002.

Jenkinson, E.J., Franchi, L.L., Kingston, R. y Owen, J.J. (1982). Effect of deoxyguanosine on lymphopoiesis in the developing thymus rudiment in vitro: application in the production of chimeric thymus rudiments. *Eur J Immunol* **12**, 583-7.

Jenkinson, W.E., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2003). Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J Exp Med* **198**, 325-32.

Jenkinson, E.J., Jenkinson, W.E., Rossi, S.W. y Anderson, G. (2006). The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nat Rev Immunol* **6**, 551-5.

Jenkinson, W.E., Rossi, S.W., Parnell, S.M., Agace, W.W., Takahama, Y., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2007a). Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol* **37**, 2090-6.

Jenkinson, W.E., Rossi, S.W., Parnell, S.M., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2007b). PDGFR α -expressing mesenchyme regulates thymus growth and the availability of intrathymic niches. *Blood* **109**, 954-60.

Jenkinson, W.E., Bacon, A., White, A.J., Anderson, G. y Jenkinson, E.J. (2008). An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. *J Immunol* **181**, 6101-8.

Jenkinson, W.E., Nakamura, K., White, A.J., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2012). Normal T cell selection occurs in CD205-deficient thymic microenvironments. *PLoS One* **7**, e53416.

Jerome, L.A. y Papaioannou, V.E. (2001). DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet* **27**, 286-91.

Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H.D., Shawber, C., Norton, C.R., Serreze, D.V., Weinmaster, G. y Gridley, T. (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* **12**, 1046-57.

Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M. y Nussenzweig, M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-5.

Jin, W., Qi, S. y Luo, H. (2011). The effect of conditional EFNB1 deletion in the T cell compartment on T cell development and function. *BMC Immunol* **12**, Art. 68.

Jin, W., Qi, S. y Luo, H. (2012). T cell-specific deletion of EFN2 minimally affects T cell development and function. *Mol Immunol* **52**, 141-7.

Jin, W., Luo, H. y Wu, J. (2014). Effect of reduced EPHB4 expression in thymic epithelial cells on thymocyte development and peripheral T cell function. *Mol Immunol* **58**, 1-9.

Juara, S. (2015). Trabajo Fin de Máster (TFM): Patrones básicos de diferenciación epitelial gobiernan la morfogénesis del primodio tímico. Universidad Complutense de Madrid.

Kajiura, F., Sun, S., Nomura, T., Izumi, K., Ueno, T., Bando, Y., Kuroda, N., Han, H., Li, Y., Matsushima, A., Takahama, Y., Sakaguchi, S., Mitani, T. y Matsumoto, M. (2004). NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J Immunol* **172**, 2067-75.

Kaufmann, E. y Knochel, W. (1996). Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* **57**, 3-20.

Kawano, H., Katayama, Y., Minagawa, K., Shimoyama, M., Henkemeyer, M. y Matsui, T. (2012). A novel feedback mechanism by Ephrin-B1/B2 in T-cell activation involves a concentration-dependent switch from costimulation to inhibition. *Eur J Immunol* **42**, 1562-72.

Kendall, M.D., Schuurman, H.J., Fenton, J., Broekhuizen, R. y Kampinga, J. (1988). Implantation of cultured thymic fragments in congenitally athymic (nude) rats. Ultrastructural characteristics of the developing microenvironment. *Cell Tissue Res* **254**, 283-94.

Khosla, S. y Ovalle, W.K. (1986). Morphology and distribution of cystic cavities in the normal murine thymus. *Cell Tissue Res* **246**, 531-42.

Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S. y Matsumoto, M. (2006). Essential role of IkappaB kinase alpha in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J Immunol* **176**, 3995-4002.

Kitamura, T., Kabuyama, Y., Kamataki, A., Homma, M.K., Kobayashi, H., Aota, S., Kikuchi, S. y Homma, Y. (2008). Enhancement of lymphocyte migration and cytokine production by ephrinB1 system in rheumatoid arthritis. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C189-96.

- Klein, L.** (2009). Dead man walking: how thymocytes scan the medulla. *Nat Immunol* **10**, 809-11.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. y Kyewski, B.** (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* **9**, 833-44.
- Klein, L. y Jovanovic, K.** (2011). Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Semin Immunol* **23**, 401-9.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M. y Hogquist, K.A.** (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* **14**, 377-91.
- Klein, R.** (2001). Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 196-203.
- Klug, D.B., Carter, C., Crouch, E., Roop, D., Conti, C.J. y Richie, E.R.** (1998). Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11822-7.
- Klug, D.B., Carter, C., Gimenez-Conti, I.B. y Richie, E.R.** (2002). Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol* **169**, 2842-5.
- Knoll, B. y Drescher, U.** (2002). Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* **25**, 145-9.
- Koble, C. y Kyewski, B.** (2009). The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med* **206**, 1505-13.
- Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N.R., Duarte, A., Macdonald, H.R. y Radtke, F.** (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med* **205**, 2515-23.
- Krueger, A., Willenzon, S., Lyszkiewicz, M., Kremmer, E. y Forster, R.** (2010). CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* **115**, 1906-12.

Kullander, K. y Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 475-86.

Laan, M., Kisand, K., Kont, V., Moll, K., Tserel, L., Scott, H.S. y Peterson, P. (2009). Autoimmune regulator deficiency results in decreased expression of CCR4 and CCR7 ligands and in delayed migration of CD4+ thymocytes. *J Immunol* **183**, 7682-91.

Lai, K.O., Chen, Y., Po, H.M., Lok, K.C., Gong, K. y Ip, N.Y. (2004). Identification of the Jak/Stat proteins as novel downstream targets of EphA4 signaling in muscle: implications in the regulation of acetylcholinesterase expression. *J Biol Chem* **279**, 13383-92.

Le Douarin, N.M. y Jotereau, F.V. (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med* **142**, 17-40.

Le Lievre, C.S. y Le Douarin, N.M. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* **34**, 125-54.

Lehar, S.M., Dooley, J., Farr, A.G. y Bevan, M.J. (2005). Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood* **105**, 1440-7.

Lei, Y., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L.T., Bosl, M.R., Hollander, G.A., Hayashi, Y., Malefyt Rde, W., Nitta, T. y Takahama, Y. (2011). Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* **208**, 383-94.

Levy, D.E. y Darnell, J.E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 651-62.

Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E. y Petrie, H.T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* **194**, 127-34.

Lindsay, E.A. (2001). Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet* **2**, 858-68.

Litt, M., Patel, B., Li, Y., Qiu, Y. y Huang, S. (2013). Molecular Morphogenesis of T-Cell Acute Leukemia. In *T-Cell Leukemia - Characteristics, Treatment and Prevention*, (ed. M. Tomita).

Liu, C., Ueno, T., Kuse, S., Saito, F., Nitta, T., Piali, L., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Hollander, G.A. y Takahama, Y. (2005). The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* **105**, 31-9.

Liu, C., Saito, F., Liu, Z., Lei, Y., Uehara, S., Love, P., Lipp, M., Kondo, S., Manley, N. y Takahama, Y. (2006). Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* **108**, 2531-9.

Liu, G., Wang, L., Pang, T., Zhu, D., Xu, Y., Wang, H., Cong, X. y Liu, Y. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells regulate thymic epithelial cell development and function in Foxn1(-/-) mice. *Cell Mol Immunol* **11**, 275-84.

Lkhagvasuren, E., Sakata, M., Ohigashi, I. y Takahama, Y. (2013). Lymphotoxin beta receptor regulates the development of CCL21-expressing subset of postnatal medullary thymic epithelial cells. *J Immunol* **190**, 5110-7.

Lomada, D., Liu, B., Coghlan, L., Hu, Y. y Richie, E.R. (2007). Thymus medulla formation and central tolerance are restored in IKKalpha-/- mice that express an IKKalpha transgene in keratin 5+ thymic epithelial cells. *J Immunol* **178**, 829-37.

Lomada, D., Jain, M., Bolner, M., Reeh, K.A., Kang, R., Reddy, M.C., DiGiovanni, J. y Richie, E.R. (2016). Stat3 Signaling Promotes Survival And Maintenance Of Medullary Thymic Epithelial Cells. *PLoS Genet* **12**, e1005777.

Lopes, N., Serge, A., Ferrier, P. y Irla, M. (2015). Thymic Crosstalk Coordinates Medulla Organization and T-Cell Tolerance Induction. *Front Immunol* **6**, Art. 365.

Lucas, B., White, A.J., Ulvmar, M.H., Nibbs, R.J., Sitnik, K.M., Agace, W.W., Jenkinson, W.E., Anderson, G. y Rot, A. (2015). CCRL1/ACKR4 is expressed in key thymic microenvironments but is dispensable for T lymphopoiesis at steady state in adult mice. *Eur J Immunol* **45**, 574-83.

Lucas, B., McCarthy, N.I., Baik, S., Cosway, E., James, K.D., Parnell, S.M., White, A.J., Jenkinson, W.E. y Anderson, G. (2016). Control of the thymic medulla and its influence on alphabetaT-cell development. *Immunol Rev* **271**, 23-37.

Luo, H., Wan, X., Wu, Y. y Wu, J. (2001). Cross-linking of EphB6 resulting in signal transduction and apoptosis in Jurkat cells. *J Immunol* **167**, 1362-70.

Luo, H., Yu, G., Tremblay, J. y Wu, J. (2004). EphB6-null mutation results in compromised T cell function. *J Clin Invest* **114**, 1762-73.

Luo, H., Charpentier, T., Wang, X., Qi, S., Han, B., Wu, T., Terra, R., Lamarre, A. y Wu, J. (2011a). Efnb1 and Efnb2 proteins regulate thymocyte development, peripheral T cell differentiation, and antiviral immune responses and are essential for interleukin-6 (IL-6) signaling. *J Biol Chem* **286**, 41135-52.

Luo, H., Wu, Z., Qi, S., Jin, W., Han, B. y Wu, J. (2011b). Ephrinb1 and Ephrinb2 are associated with interleukin-7 receptor alpha and retard its internalization from the cell surface. *J Biol Chem* **286**, 44976-87.

Luo, H., Broux, B., Wang, X., Hu, Y., Ghannam, S., Jin, W., Larochelle, C., Prat, A. y Wu, J. (2016). EphrinB1 and EphrinB2 regulate T cell chemotaxis and migration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* **91**, 292-306.

Mancini, S.J., Mantei, N., Dumortier, A., Suter, U., MacDonald, H.R. y Radtke, F. (2005). Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* **105**, 2340-2.

Manley, N.R. y Capecchi, M.R. (1995). The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* **121**, 1989-2003.

Manley, N.R. (2000). Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin Immunol* **12**, 421-8.

Manley, N.R. y Blackburn, C.C. (2003). A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Current Opinion in Immunology* **15**, 225-232.

Manley, N.R., Richie, E.R., Blackburn, C.C., Condie, B.G. y Sage, J. (2011). Structure and function of the thymic microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**, 2461-77.

Marrella, V., Poliani, P.L., Notarangelo, L.D., Grassi, F. y Villa, A. (2014). Rag defects and thymic stroma: lessons from animal models. *Front Immunol* **5**, Art. 259.

Martin-Fontecha, A., Broekhuizen, R., de Heer, C., Zapata, A. y Schuurman, H.J. (1992). Transplantation of cultured thymic fragments in congenitally athymic and euthymic rats. Culture with deoxyguanosine or cyclosporin A does not influence the histologic characteristics and outcome after transplantation in syngeneic and allogeneic combinations. *Scand J Immunol* **35**, 575-87.

Martins, V.C., Boehm, T. y Bleul, C.C. (2008). Ltbetar signaling does not regulate Aire-dependent transcripts in medullary thymic epithelial cells. *J Immunol* **181**, 400-7.

Masuda, K., Kubagawa, H., Ikawa, T., Chen, C.C., Kakugawa, K., Hattori, M., Kageyama, R., Cooper, M.D., Minato, N., Katsura, Y. y Kawamoto, H. (2005). Prethymic T-cell development defined by the expression of paired immunoglobulin-like receptors. *EMBO J* **24**, 4052-60.

Mathis, D. y Benoist, C. (2009). Aire. *Annu Rev Immunol* **27**, 287-312.

Matsuda, J.L. y Gapin, L. (2005). Developmental program of mouse Valpha14i NKT cells. *Curr Opin Immunol* **17**, 122-30.

McCarthy, M.K. y Weinberg, J.B. (2015). The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front Microbiol* **6**, Art. 21.

McCaughy, T.M., Wilken, M.S. y Hogquist, K.A. (2007). Thymic emigration revisited. *J Exp Med* **204**, 2513-20.

McQualter, J.L., Yuen, K., Williams, B. y Bertoncello, I. (2010). Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1414-9.

Mecklenburg, L., Tychsen, B. y Paus, R. (2005). Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Exp Dermatol* **14**, 797-810.

Mellitzer, G., Xu, Q. y Wilkinson, D.G. (2000). Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 400-8.

Mendes-da-Cruz, D.A., Stimamiglio, M.A., Munoz, J.J., Alfaro, D., Terra-Granado, E., Garcia-Ceca, J., Alonso-Colmenar, L.M., Savino, W. y Zapata, A.G. (2012). Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. *FASEB J* **26**, 4390-9.

Mohtashami, M. y Zuniga-Pflucker, J.C. (2006). Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development. *J Immunol* **176**, 730-4.

Montecino-Rodriguez, E., Johnson, A. y Dorshkind, K. (1996). Thymic stromal cells can support B cell differentiation from intrathymic precursors. *J Immunol* **156**, 963-7.

Moore-Scott, B.A. y Manley, N.R. (2005). Differential expression of Sonic hedgehog along the anterior-posterior axis regulates patterning of pharyngeal pouch endoderm and pharyngeal endoderm-derived organs. *Dev Biol* **278**, 323-35.

Mori, K., Itoi, M., Tsukamoto, N. y Amagai, T. (2010). Foxn1 is essential for vascularization of the murine thymus anlage. *Cell Immunol* **260**, 66-9.

Mouri, Y., Yano, M., Shinzawa, M., Shimo, Y., Hirota, F., Nishikawa, Y., Nii, T., Kiyonari, H., Abe, T., Uehara, H., Izumi, K., Tamada, K., Chen, L., Penninger, J.M., Inoue, J., Akiyama, T. y Matsumoto, M. (2011). Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma. *J Immunol* **186**, 5047-57.

Munoz, J.J., Alonso, C.L., Sacedon, R., Crompton, T., Vicente, A., Jimenez, E., Varas, A. y Zapata, A.G. (2002). Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. *J Immunol* **169**, 177-84.

- Munoz, J.J., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J., Alonso, C.L., Jimenez, E. y Zapata, A.** (2006). Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J Immunol* **177**, 804-13.
- Munoz, J.J., Garcia-Ceca, J., Alfaro, D., Stimamiglio, M.A., Cejalvo, T., Jimenez, E. y Zapata, A.G.** (2009). Organizing the thymus gland. *Ann N Y Acad Sci* **1153**, 14-9.
- Munoz, J.J., Cejalvo, T., Tobajas, E., Fanlo, L., Cortes, A. y Zapata, A.G.** (2015). 3D immunofluorescence analysis of early thymic morphogenesis and medulla development. *Histol Histopathol* **30**, 589-99.
- Munthe, E., Rian, E., Holien, T., Rasmussen, A., Levy, F.O. y Aasheim, H.** (2000). Ephrin-B2 is a candidate ligand for the Eph receptor, EphB6. *FEBS Lett* **466**, 169-74.
- Murai, K.K. y Pasquale, E.B.** (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* **116**, 2823-32.
- Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y. y Tanaka, K.** (2007). Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349-53.
- Nakada, M., Niska, J.A., Miyamori, H., McDonough, W.S., Wu, J., Sato, H. y Berens, M.E.** (2004). The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Res* **64**, 3179-85.
- Nakagawa, Y., Ohigashi, I., Nitta, T., Sakata, M., Tanaka, K., Murata, S., Kanagawa, O. y Takahama, Y.** (2012). Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary T cell receptor alpha rearrangement in cortical thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 20572-7.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N. y Klein, L.** (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* **455**, 396-400.
- Nehls, M., Kyewski, B., Messerle, M., Waldschutz, R., Schuddekopf, K., Smith, A.J. y Boehm, T.** (1996). Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* **272**, 886-9.

Neves, H., Dupin, E., Parreira, L. y Le Douarin, N.M. (2012). Modulation of Bmp4 signalling in the epithelial-mesenchymal interactions that take place in early thymus and parathyroid development in avian embryos. *Dev Biol* **361**, 208-19.

Nikolov, D.B., Li, C., Barton, W.A. y Himanen, J.P. (2005). Crystal structure of the ephrin-B1 ectodomain: implications for receptor recognition and signaling. *Biochemistry* **44**, 10947-53.

Nishikawa, Y., Hirota, F., Yano, M., Kitajima, H., Miyazaki, J., Kawamoto, H., Mouri, Y. y Matsumoto, M. (2010). Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation. *J Exp Med* **207**, 963-71.

Nitta, T., Nitta, S., Lei, Y., Lipp, M. y Takahama, Y. (2009). CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17129-33.

Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K. y Takahama, Y. (2010). Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* **32**, 29-40.

Noberini, R., Rubio de la Torre, E. y Pasquale, E.B. (2012). Profiling Eph receptor expression in cells and tissues: a targeted mass spectrometry approach. *Cell Adh Migr* **6**, 102-12.

Noren, N.K., Yang, N.Y., Silldorff, M., Mutyala, R. y Pasquale, E.B. (2009). Ephrin-independent regulation of cell substrate adhesion by the EphB4 receptor. *Biochem J* **422**, 433-42.

Nowell, C.S., Bredenkamp, N., Tetelin, S., Jin, X., Tischner, C., Vaidya, H., Sheridan, J.M., Stenhouse, F.H., Heussen, R., Smith, A.J. y Blackburn, C.C. (2011). Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS Genet* **7**, e1002348.

O'Neill, K.E., Bredenkamp, N., Tischner, C., Vaidya, H.J., Stenhouse, F.H., Peddie, C.D., Nowell, C.S., Gaskell, T. y Blackburn, C.C. (2016). Foxn1 Is Dynamically Regulated in Thymic Epithelial Cells during Embryogenesis and at the Onset of Thymic Involution. *PLoS One* **11**, e0151666.

Odaka, C., Loranger, A., Takizawa, K., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Murata, S., Inoko, A., Inagaki, M. y Marceau, N. (2013). Keratin 8 is required for the maintenance of architectural structure in thymus epithelium. *PLoS One* **8**, e75101.

Ohigashi, I., Zuklys, S., Sakata, M., Mayer, C.E., Zhanybekova, S., Murata, S., Tanaka, K., Hollander, G.A. y Takahama, Y. (2013). Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from beta5t-expressing progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9885-90.

Ohigashi, I. y Takahama, Y. (2014). CCRL1 marks heterogeneity in cortical and medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* **44**, 2872-5.

Ohigashi, I., Zuklys, S., Sakata, M., Mayer, C.E., Hamazaki, Y., Minato, N., Hollander, G.A. y Takahama, Y. (2015). Adult Thymic Medullary Epithelium Is Maintained and Regenerated by Lineage-Restricted Cells Rather Than Bipotent Progenitors. *Cell Rep* **13**, 1432-43.

Ohigashi, I., Kozai, M. y Takahama, Y. (2016). Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells. *Immunol Rev* **271**, 10-22.

Onder, L., Nindl, V., Scandella, E., Chai, Q., Cheng, H.W., Caviezel-Firner, S., Novkovic, M., Bomze, D., Maier, R., Mair, F., Ledermann, B., Becher, B., Waisman, A. y Ludewig, B. (2015). Alternative NF-kappaB signaling regulates mTEC differentiation from podoplanin-expressing presursors in the cortico-medullary junction. *Eur J Immunol* **45**, 2218-31.

Orioli, D., Henkemeyer, M., Lemke, G., Klein, R. y Pawson, T. (1996). Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *EMBO J* **15**, 6035-49.

Ortman, C.L., Dittmar, K.A., Witte, P.L. y Le, P.T. (2002). Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int Immunol* **14**, 813-22.

Osada, M., Ito, E., Fermin, H.A., Vazquez-Cintron, E., Venkatesh, T., Friedel, R.H. y Pezzano, M. (2006). The Wnt signaling antagonist Kremen1 is required for development of thymic architecture. *Clin Dev Immunol* **13**, 299-319.

Osada, M., Jardine, L., Misir, R., Andl, T., Millar, S.E. y Pezzano, M. (2010). DKK1 mediated inhibition of Wnt signaling in postnatal mice leads to loss of TEC progenitors and thymic degeneration. *PLoS One* **5**, e9062.

Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **3**, 383-91.

Pan, B., Liu, J., Zhang, Y., Sun, Y., Wu, Q., Zhao, K., Zeng, L. y Xu, K. (2014). Acute ablation of DP thymocytes induces up-regulation of IL-22 and Foxn1 in TECs. *Clin Immunol* **150**, 101-8.

Park, E.K., Warner, N., Bong, Y.S., Stapleton, D., Maeda, R., Pawson, T. y Daar, I.O. (2004). Ectopic EphA4 receptor induces posterior protrusions via FGF signaling in *Xenopus* embryos. *Mol Biol Cell* **15**, 1647-55.

Pasquale, E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 462-75.

Pasquale, E.B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133**, 38-52.

Patel, N., Sharpe, P.T. y Miletich, I. (2011). Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. *Dev Biol* **358**, 156-67.

Patel, S.R., Gordon, J., Mahbub, F., Blackburn, C.C. y Manley, N.R. (2006). Bmp4 and Noggin expression during early thymus and parathyroid organogenesis. *Gene Expr Patterns* **6**, 794-9.

Pendaries, V., Verrecchia, F., Michel, S. y Mauviel, A. (2003). Retinoic acid receptors interfere with the TGF-beta/Smad signaling pathway in a ligand-specific manner. *Oncogene* **22**, 8212-20.

Perera, J., Meng, L., Meng, F. y Huang, H. (2013). Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 17011-6.

Perez White, B.E. y Getsios, S. (2014). Eph receptor and ephrin function in breast, gut, and skin epithelia. *Cell Adh Migr* **8**, 327-38.

Petrie, H.T. y Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* **25**, 649-79.

Pfaff, D., Heroult, M., Riedel, M., Reiss, Y., Kirmse, R., Ludwig, T., Korff, T., Hecker, M. y Augustin, H.G. (2008). Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. *J Cell Sci* **121**, 3842-50.

Pignata, C., Fiore, M., Guzzetta, V., Castaldo, A., Sebastio, G., Porta, F. y Guarino, A. (1996). Congenital Alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am J Med Genet* **65**, 167-70.

Pignata, C. (2002). A lesson for unraveling complex aspects of novel immunodeficiencies from the human equivalent of the nude/SCID phenotype. *J Hematother Stem Cell Res* **11**, 409-14.

Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G. y Jenkinson, E.J. (2003). Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur J Immunol* **33**, 1949-56.

Porritt, H.E., Gordon, K. y Petrie, H.T. (2003). Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med* **198**, 957-62.

Ramond, C., Berthault, C., Burlen-Defranoux, O., de Sousa, A.P., Guy-Grand, D., Vieira, P., Pereira, P. y Cumano, A. (2014). Two waves of distinct hematopoietic progenitor cells colonize the fetal thymus. *Nat Immunol* **15**, 27-35.

Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M. y Peltonen, L. (2002). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* **11**, 397-409.

Revest, J.M., Suniara, R.K., Kerr, K., Owen, J.J. y Dickson, C. (2001). Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J Immunol* **167**, 1954-61.

Ribeiro, A.R., Rodrigues, P.M., Meireles, C., Di Santo, J.P. y Alves, N.L. (2013). Thymocyte selection regulates the homeostasis of IL-7-expressing thymic cortical epithelial cells in vivo. *J Immunol* **191**, 1200-9.

Ribeiro, A.R., Meireles, C., Rodrigues, P.M. y Alves, N.L. (2014). Intermediate expression of CCRL1 reveals novel subpopulations of medullary thymic epithelial cells that emerge in the postnatal thymus. *Eur J Immunol* **44**, 2918-24.

Ricard, J., Salinas, J., Garcia, L. y Liebl, D.J. (2006). EphrinB3 regulates cell proliferation and survival in adult neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* **31**, 713-22.

Ripen, A.M., Nitta, T., Murata, S., Tanaka, K. y Takahama, Y. (2011). Ontogeny of thymic cortical epithelial cells expressing the thymoproteasome subunit beta5t. *Eur J Immunol* **41**, 1278-87.

Roberts, N. y Horsley, V. (2014). Developing stratified epithelia: lessons from the epidermis and thymus. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **3**, 389-402.

Roberts, N.A., Desanti, G.E., Withers, D.R., Scott, H.R., Jenkinson, W.E., Lane, P.J., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2009). Absence of thymus crosstalk in the fetus does not preclude hematopoietic induction of a functional thymus in the adult. *Eur J Immunol* **39**, 2395-402.

Roberts, N.A., White, A.J., Jenkinson, W.E., Turchinovich, G., Nakamura, K., Withers, D.R., McConnell, F.M., Desanti, G.E., Benezech, C., Parnell, S.M., Cunningham, A.F., Paolino, M., Penninger, J.M., Simon, A.K., Nitta, T., Ohigashi, I., Takahama, Y., Caamano, J.H., Hayday, A.C., Lane, P.J., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2012). Rank signaling links the development of invariant gammadelta T cell progenitors and Aire(+) medullary epithelium. *Immunity* **36**, 427-37.

Robertson, P., Means, T.K., Luster, A.D. y Scadden, D.T. (2006). CXCR4 and CCR5 mediate homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus. *Exp Hematol* **34**, 308-19.

Rode, I. y Boehm, T. (2012). Regenerative capacity of adult cortical thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3463-8.

Rodewald, H.R., Paul, S., Haller, C., Bluethmann, H. y Blum, C. (2001). Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature* **414**, 763-8.

Rodewald, H.R. (2008). Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**, 355-88.

Roman, E., Shino, H., Qin, F.X. y Liu, Y.J. (2010). Cutting edge: Hematopoietic-derived APCs select regulatory T cells in thymus. *J Immunol* **185**, 3819-23.

Romano, R., Palamaro, L., Fusco, A., Giardino, G., Gallo, V., Del Vecchio, L. y Pignata, C. (2013). FOXP1: A Master Regulator Gene of Thymic Epithelial Development Program. *Front Immunol* **4**, Art. 187.

Ropke, C. (1997). Thymic epithelial cell culture. *Microsc Res Tech* **38**, 276-86.

Rossi, S.W., Jenkinson, W.E., Anderson, G. y Jenkinson, E.J. (2006). Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* **441**, 988-91.

Rossi, S.W., Chidgey, A.P., Parnell, S.M., Jenkinson, W.E., Scott, H.S., Boyd, R.L., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2007a). Redefining epithelial progenitor potential in the developing thymus. *Eur J Immunol* **37**, 2411-8.

Rossi, S.W., Jeker, L.T., Ueno, T., Kuse, S., Keller, M.P., Zuklys, S., Gudkov, A.V., Takahama, Y., Krenger, W., Blazar, B.R. y Hollander, G.A. (2007b). Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood* **109**, 3803-11.

Rossi, S.W., Kim, M.Y., Leibbrandt, A., Parnell, S.M., Jenkinson, W.E., Glanville, S.H., McConnell, F.M., Scott, H.S., Penninger, J.M., Jenkinson, E.J., Lane, P.J. y Anderson, G. (2007c). RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med* **204**, 1267-72.

Rothenberg, E.V., Moore, J.E. y Yui, M.A. (2008). Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* **8**, 9-21.

Saldana, J.I., Solanki, A., Lau, C.I., Sahni, H., Ross, S., Furmanski, A.L., Ono, M., Hollander, G. y Crompton, T. (2016). Sonic Hedgehog regulates thymic epithelial cell differentiation. *J Autoimmun* **68**, 86-97.

Sanchez, M.J., Muench, M.O., Roncarolo, M.G., Lanier, L.L. y Phillips, J.H. (1994). Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* **180**, 569-76.

Sano, S., Takahama, Y., Sugawara, T., Kosaka, H., Itami, S., Yoshikawa, K., Miyazaki, J., van Ewijk, W. y Takeda, J. (2001). Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity* **15**, 261-73.

Sasaki, K., Takada, K., Ohte, Y., Kondo, H., Sorimachi, H., Tanaka, K., Takahama, Y. y Murata, S. (2015). Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8(+) T cells. *Nat Commun* **6**, Art. 7484.

Schmitt, T.M. y Zuniga-Pflucker, J.C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* **17**, 749-56.

Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T. y Zuniga-Pflucker, J.C. (2004). Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med* **200**, 469-79.

Schorpp, M., Hofmann, M., Dear, T.N. y Boehm, T. (1997). Characterization of mouse and human nude genes. *Immunogenetics* **46**, 509-15.

Seach, N., Ueno, T., Fletcher, A.L., Lowen, T., Mattesich, M., Engwerda, C.R., Scott, H.S., Ware, C.F., Chidgey, A.P., Gray, D.H. y Boyd, R.L. (2008). The lymphotoxin pathway regulates Aire-independent expression of ectopic genes and chemokines in thymic stromal cells. *J Immunol* **180**, 5384-92.

Seach, N., Wong, K., Hammett, M., Boyd, R.L. y Chidgey, A.P. (2012). Purified enzymes improve isolation and characterization of the adult thymic epithelium. *J Immunol Methods* **385**, 23-34.

Seach, N., Hammett, M. y Chidgey, A. (2013). Isolation, characterization, and reaggregate culture of thymic epithelial cells. *Methods Mol Biol* **945**, 251-72.

Sekai, M., Hamazaki, Y. y Minato, N. (2014). Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance. *Immunity* **41**, 753-61.

Senoo, M., Pinto, F., Crum, C.P. y McKeon, F. (2007). p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* **129**, 523-36.

Shah, D.K. y Zuniga-Pflucker, J.C. (2014). An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol* **192**, 4017-23.

Shakib, S., Desanti, G.E., Jenkinson, W.E., Parnell, S.M., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2009). Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells. *J Immunol* **182**, 130-7.

Shao, H., Kono, D.H., Chen, L.Y., Rubin, E.M. y Kaye, J. (1997). Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection. *J Exp Med* **185**, 731-44.

Sharfe, N., Freywald, A., Toro, A., Dadi, H. y Roifman, C. (2002). Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur J Immunol* **32**, 3745-55.

Sharfe, N., Nikolic, M., Cimpeon, L., Van De Kratts, A., Freywald, A. y Roifman, C.M. (2008). EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. *Mol Immunol* **45**, 1208-20.

Shimoyama, M., Matsuoka, H., Tamekane, A., Ito, M., Iwata, N., Inoue, R., Chihara, K., Furuya, A., Hanai, N. y Matsui, T. (2000). T-cell-specific expression of kinase-defective Eph-family receptor protein, EphB6 in normal as well as transformed hematopoietic cells. *Growth Factors* **18**, 63-78.

Shimoyama, M., Matsuoka, H., Nagata, A., Iwata, N., Tamekane, A., Okamura, A., Gomyo, H., Ito, M., Jishage, K., Kamada, N., Suzuki, H., Tetsuo Noda, T. y Matsui, T. (2002). Developmental expression of EphB6 in the thymus: lessons from EphB6 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 87-94.

Shinohara, T. y Honjo, T. (1997). Studies in vitro on the mechanism of the epithelial/mesenchymal interaction in the early fetal thymus. *Eur J Immunol* **27**, 522-9.

Shores, E.W., Van Ewijk, W. y Singer, A. (1991). Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* **21**, 1657-61.

Siggs, O.M., Makaroff, L.E. y Liston, A. (2006). The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol* **18**, 175-83.

Sitnik, K.M., Kotarsky, K., White, A.J., Jenkinson, W.E., Anderson, G. y Agace, W.W. (2012). Mesenchymal cells regulate retinoic acid receptor-dependent cortical thymic epithelial cell homeostasis. *J Immunol* **188**, 4801-9.

Smith, K.M., Olson, D.C., Hirose, R. y Hanahan, D. (1997). Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol* **9**, 1355-65.

Soza-Ried, C., Bleul, C.C., Schorpp, M. y Boehm, T. (2008). Maintenance of thymic epithelial phenotype requires extrinsic signals in mouse and zebrafish. *J Immunol* **181**, 5272-7.

Stein, E., Lane, A.A., Cerretti, D.P., Schoecklmann, H.O., Schroff, A.D., Van Etten, R.L. y Daniel, T.O. (1998). Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev* **12**, 667-78.

Stimamiglio, M.A., Jimenez, E., Silva-Barbosa, S.D., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J.J., Munoz, J.J., Cejalvo, T., Savino, W. y Zapata, A. (2010). EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. *J Leukoc Biol* **88**, 483-94.

Su, D., Ellis, S., Napier, A., Lee, K. y Manley, N.R. (2001). Hoxa3 and pax1 regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis. *Dev Biol* **236**, 316-29.

Su, D.M. y Manley, N.R. (2000). Hoxa3 and pax1 transcription factors regulate the ability of fetal thymic epithelial cells to promote thymocyte development. *J Immunol* **164**, 5753-60.

Su, D.M., Navarre, S., Oh, W.J., Condie, B.G. y Manley, N.R. (2003). A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol* **4**, 1128-35.

Suenobu, S., Takakura, N., Inada, T., Yamada, Y., Yuasa, H., Zhang, X.Q., Sakano, S., Oike, Y. y Suda, T. (2002). A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1124-31.

Sun, L., Guo, J., Brown, R., Amagai, T., Zhao, Y. y Su, D.M. (2010). Declining expression of a single epithelial cell-autonomous gene accelerates age-related thymic involution. *Aging Cell* **9**, 347-57.

Sun, L., Luo, H., Li, H. y Zhao, Y. (2013). Thymic epithelial cell development and differentiation: cellular and molecular regulation. *Protein Cell* **4**, 342-55.

Sun, L., Li, H., Luo, H. y Zhao, Y. (2014). Thymic epithelial cell development and its dysfunction in human diseases. *Biomed Res Int* **2014**, Art. 206929.

Suniara, R.K., Jenkinson, E.J. y Owen, J.J. (2000). An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med* **191**, 1051-6.

Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T. y Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* **163**, 975-87.

Takada, K., Ohigashi, I., Kasai, M., Nakase, H. y Takahama, Y. (2014). Development and function of cortical thymic epithelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **373**, 1-17.

Takano-Maruyama, M., Hase, K., Fukamachi, H., Kato, Y., Koseki, H. y Ohno, H. (2006). Foxl1-deficient mice exhibit aberrant epithelial cell positioning resulting from dysregulated EphB/EphrinB expression in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G163-70.

Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M. y Honjo, T. (2004). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* **20**, 611-22.

Terunuma, A., Kapoor, V., Yee, C., Telford, W.G., Udey, M.C. y Vogel, J.C. (2007). Stem cell activity of human side population and alpha6 integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay. *Stem Cells* **25**, 664-9.

Thomas, L.R., Cobb, R.M. y Oltz, E.M. (2009). Dynamic regulation of antigen receptor gene assembly. *Adv Exp Med Biol* **650**, 103-15.

Thompson, P.K. y Zuniga-Pflucker, J.C. (2011). On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. *Semin Immunol* **23**, 350-9.

Ting, M.J. y Boyd, A.W. (2008). The role of Eph receptor tyrosine kinase and ephrin ligands in hematopoietic cell development and function. *The Open Hematology Journal* **2**, 103-110.

Tobajas, E. (2015). Tesis doctoral: Desarrollo y diferenciación del epitelio tímico. Universidad Complutense de Madrid.

Trinidad, E.M., Zapata, A.G. y Alonso-Colmenar, L.M. (2010). Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration. *Cell Adh Migr* **4**, 363-7.

Tsai, P.T., Lee, R.A. y Wu, H. (2003). BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood* **102**, 3947-53.

Ucar, A., Ucar, O., Klug, P., Matt, S., Brunk, F., Hofmann, T.G. y Kyewski, B. (2014). Adult thymus contains FoxN1(-) epithelial stem cells that are bipotent for medullary and cortical thymic epithelial lineages. *Immunity* **41**, 257-69.

Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L. y Takahama, Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* **200**, 493-505.

Ulyanchenko, S., O'Neill, K.E., Medley, T., Farley, A.M., Vaidya, H.J., Cook, A.M., Blair, N.F. y Blackburn, C.C. (2016). Identification of a Bipotent Epithelial Progenitor Population in the Adult Thymus. *Cell Rep* **14**, 2819-32.

Vaidya, H.J., Briones Leon, A. y Blackburn, C.C. (2016). FOXP1 in thymus organogenesis and development. *Eur J Immunol* **46**, 1826-37.

van Buul-Offers, S.C., de Haan, K., Reijnen-Gresnigt, M.G., Meinsma, D., Jansen, M., Oei, S.L., Bonte, E.J., Sussenbach, J.S. y Van den Brande, J.L. (1995). Overexpression of human insulin-like growth factor-II in transgenic mice causes increased growth of the thymus. *J Endocrinol* **144**, 491-502.

van Ewijk, W., Shores, E.W. y Singer, A. (1994). Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* **15**, 214-7.

van Ewijk, W., Wang, B., Hollander, G., Kawamoto, H., Spanopoulou, E., Itoi, M., Amagai, T., Jiang, Y.F., Germeraad, W.T., Chen, W.F. y Katsura, Y. (1999). Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin Immunol* **11**, 57-64.

van Ewijk, W., Kawamoto, H., Germeraad, W.T. y Katsura, Y. (2000). Developing thymocytes organize thymic microenvironments. *Curr Top Microbiol Immunol* **251**, 125-32.

Van Vliet, E., Melis, M. y Van Ewijk, W. (1984). Monoclonal antibodies to stromal cell types of the mouse thymus. *Eur J Immunol* **14**, 524-9.

Venanzi, E.S., Gray, D.H., Benoist, C. y Mathis, D. (2007). Lymphotoxin pathway and Aire influences on thymic medullary epithelial cells are unconnected. *J Immunol* **179**, 5693-700.

Vergara-Silva, A., Schaefer, K.L. y Berg, L.J. (2002). Compartmentalized Eph receptor and ephrin expression in the thymus. *Mech Dev* **119 Suppl 1**, S225-9.

Vigliano, I., Gorrese, M., Fusco, A., Vitiello, L., Amorosi, S., Panico, L., Ursini, M.V., Calcagno, G., Racioppi, L., Del Vecchio, L. y Pignata, C. (2011). FOXP1 mutation abrogates prenatal T-cell development in humans. *J Med Genet* **48**, 413-6.

Viret, C., Lamare, C., Guiraud, M., Fazilleau, N., Bour, A., Malissen, B., Carrier, A. y Guerder, S. (2011). Thymus-specific serine protease contributes to the diversification of the functional endogenous CD4 T cell receptor repertoire. *J Exp Med* **208**, 3-11.

Vroegindeweij, E., Crobach, S., Itoi, M., Satoh, R., Zuklys, S., Happe, C., Germeraad, W.T., Cornelissen, J.J., Cupedo, T., Hollander, G.A., Kawamoto, H. y van Ewijk, W. (2010). Thymic cysts originate from Foxn1 positive thymic medullary epithelium. *Mol Immunol* **47**, 1106-13.

Walters, S.N., Webster, K.E., Daley, S. y Grey, S.T. (2014). A role for intrathymic B cells in the generation of natural regulatory T cells. *J Immunol* **193**, 170-6.

Wang, X., Laan, M., Bichele, R., Kisand, K., Scott, H.S. y Peterson, P. (2012). Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front Immunol* **3**, Art. 19.

Wang, Z., Miura, N., Bonelli, A., Mole, P., Carlesso, N., Olson, D.P. y Scadden, D.T. (2002). Receptor tyrosine kinase, EphB4 (HTK), accelerates differentiation of select human hematopoietic cells. *Blood* **99**, 2740-7.

Wang, Z., Dolle, P., Cardoso, W.V. y Niederreither, K. (2006). Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives. *Dev Biol* **297**, 433-45.

Wei, Q. y Condie, B.G. (2011). A focused in situ hybridization screen identifies candidate transcriptional regulators of thymic epithelial cell development and function. *PLoS One* **6**, e26795.

Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., Ryseck, R.P., Lira, S.A. y Bravo, R. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* **80**, 331-40.

Wekerle, H., Ketelsen, U.P. y Ernst, M. (1980). Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J Exp Med* **151**, 925-44.

Welm, B.E., Tepera, S.B., Venezia, T., Graubert, T.A., Rosen, J.M. y Goodell, M.A. (2002). Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol* **245**, 42-56.

Wendling, O., Dennefeld, C., Chambon, P. y Mark, M. (2000). Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development* **127**, 1553-62.

Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M.T., Krieg, T., Hofschneider, P.H. y Williams, L.T. (1994). The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* **266**, 819-22.

White, A.J., Withers, D.R., Parnell, S.M., Scott, H.S., Finke, D., Lane, P.J., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2008). Sequential phases in the development of Aire-expressing medullary thymic epithelial cells involve distinct cellular input. *Eur J Immunol* **38**, 942-7.

White, A.J., Nakamura, K., Jenkinson, W.E., Saini, M., Sinclair, C., Seddon, B., Narendran, P., Pfeffer, K., Nitta, T., Takahama, Y., Caamano, J.H., Lane, P.J., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2010). Lymphotoxin signals from positively selected thymocytes regulate the terminal differentiation of medullary thymic epithelial cells. *J Immunol* **185**, 4769-76.

White, A.J., Jenkinson, W.E., Cowan, J.E., Parnell, S.M., Bacon, A., Jones, N.D., Jenkinson, E.J. y Anderson, G. (2014). An essential role for medullary thymic epithelial cells during the intrathymic development of invariant NKT cells. *J Immunol* **192**, 2659-66.

Wilkinson, D.G. (2003). How attraction turns to repulsion. *Nat Cell Biol* **5**, 851-3.

Wilson, A., Pircher, H., Ohashi, P. y MacDonald, H.R. (1992). Analysis of immature (CD4-CD8-) thymic subsets in T-cell receptor alpha beta transgenic mice. *Dev Immunol* **2**, 85-94.

Winning, R.S., Wyman, T.L. y Walker, G.K. (2001). EphA4 activity causes cell shape change and a loss of cell polarity in *Xenopus laevis* embryos. *Differentiation* **68**, 126-32.

Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H.R. y Radtke, F. (2002). Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* **16**, 869-79.

Wong, K., Lister, N.L., Barsanti, M., Lim, J.M., Hammett, M.V., Khong, D.M., Siatskas, C., Gray, D.H., Boyd, R.L. y Chidgey, A.P. (2014). Multilineage potential and self-renewal define an epithelial progenitor cell population in the adult thymus. *Cell Rep* **8**, 1198-209.

Wu, J. y Luo, H. (2005). Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Hematol* **12**, 292-7.

Xia, J., Wang, H., Guo, J., Zhang, Z., Coder, B. y Su, D.M. (2012). Age-Related Disruption of Steady-State Thymic Medulla Provokes Autoimmune Phenotype via Perturbing Negative Selection. *Aging Dis* **3**, 248-59.

Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y. y Matsumoto, M. (2008). Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med* **205**, 2827-38.

Yokote, H., Fujita, K., Jing, X., Sawada, T., Liang, S., Yao, L., Yan, X., Zhang, Y., Schlessinger, J. y Sakaguchi, K. (2005). Trans-activation of EphA4 and FGFreceptors mediated by direct interactions between their cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18866-71.

Yu, G., Luo, H., Wu, Y. y Wu, J. (2004). EphrinB1 is essential in T-cell-T-cell co-operation during T-cell activation. *J Biol Chem* **279**, 55531-9.

Yu, G., Mao, J., Wu, Y., Luo, H. y Wu, J. (2006). Ephrin-B1 is critical in T-cell development. *J Biol Chem* **281**, 10222-9.

Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Wang, L., Wei, W., Kane, A.B. y Chin, Y.E. (2004). Central role of the threonine residue within the p+1 loop of receptor tyrosine kinase in STAT3 constitutive phosphorylation in metastatic cancer cells. *Mol Cell Biol* **24**, 9390-400.

Yue, Y., Su, J., Cerretti, D.P., Fox, G.M., Jing, S. y Zhou, R. (1999). Selective inhibition of spinal cord neurite outgrowth and cell survival by the Eph family ligand ephrin-A5. *J Neurosci* **19**, 10026-35.

Zamisch, M., Moore-Scott, B., Su, D.M., Lucas, P.J., Manley, N. y Richie, E.R. (2005). Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J Immunol* **174**, 60-7.

Zamora, D.O., Babra, B., Pan, Y., Planck, S.R. y Rosenbaum, J.T. (2006). Human leukocytes express ephrinB2 which activates microvascular endothelial cells. *Cell Immunol* **242**, 99-109.

Zhang, B., Wang, Z., Ding, J., Peterson, P., Gunning, W.T. y Ding, H.F. (2006). NF-kappaB2 is required for the control of autoimmunity by regulating the development of medullary thymic epithelial cells. *J Biol Chem* **281**, 38617-24.

Zhang, S.L. y Bhandoola, A. (2014). Trafficking to the thymus. *Curr Top Microbiol Immunol* **373**, 87-111.

Zhang, Z., Burnley, P., Coder, B. y Su, D.M. (2012). Insights on FoxN1 biological significance and usages of the "nude" mouse in studies of T-lymphopoiesis. *Int J Biol Sci* **8**, 1156-67.

Zhu, M., Chin, R.K., Christiansen, P.A., Lo, J.C., Liu, X., Ware, C., Siebenlist, U. y Fu, Y.X. (2006). NF-kappaB2 is required for the establishment of central tolerance through an Aire-dependent pathway. *J Clin Invest* **116**, 2964-71.

Zhu, M. y Fu, Y. (2010). The complicated role of NF-kappaB in T-cell selection. *Cell Mol Immunol* **7**, 89-93.

Zlotoff, D.A., Sambandam, A., Logan, T.D., Bell, J.J., Schwarz, B.A. y Bhandoola, A. (2010). CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* **115**, 1897-905.

Zlotoff, D.A. y Bhandoola, A. (2011). Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Ann N Y Acad Sci* **1217**, 122-38.

Zook, E.C., Krishack, P.A., Zhang, S., Zeleznik-Le, N.J., Firulli, A.B., Witte, P.L. y Le, P.T. (2011). Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood* **118**, 5723-31.

Zou, D., Silvius, D., Davenport, J., Grifone, R., Maire, P. y Xu, P.X. (2006). Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Dev Biol* **293**, 499-512.

Zuklys, S., Gill, J., Keller, M.P., Hauri-Hohl, M., Zhanybekova, S., Balciunaite, G., Na, K.J., Jeker, L.T., Hafen, K., Tsukamoto, N., Amagai, T., Taketo, M.M., Krenger, W. y Hollander, G.A. (2009). Stabilized beta-catenin in thymic epithelial cells blocks thymus development and function. *J Immunol* **182**, 2997-3007.



ANEXO IV

(ARTÍCULOS PUBLICADOS)

- **Montero-Herradon, S.**, Garcia-Ceca, J., Sanchez Del Collado, B., Alfaro, D. y Zapata, A.G. **(2016)**. Eph/ephrin-B-mediated cell-to-cell interactions govern MTS20(+) thymic epithelial cell development. *Histochem Cell Biol* 146, 167-82.

- Alfaro, D., Garcia-Ceca, J., Farias-de-Oliveira, D.A., Terra-Granado, E., **Montero-Herradon, S.**, Cotta-de-Almeida, V., Savino, W. y Zapata, A. **(2015)**. EphB2 and EphB3 play an important role in the lymphoid seeding of murine adult thymus. *J Leukoc Biol* 98, 883-96.

- Garcia-Ceca, J., Alfaro, D., **Montero-Herradon, S.**, Tobajas, E., Munoz, J.J. y Zapata, A.G. **(2015)**. Eph/Ephrins-Mediated Thymocyte-Thymic Epithelial Cell Interactions Control Numerous Processes of Thymus Biology. *Front Immunol* 6, Art. 333.

- Garcia-Ceca, J., Alfaro, D., **Montero-Herradon, S.** y Zapata, A.G. **(2013)**. Eph/ephrinB signalling is involved in the survival of thymic epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 91, 130-8.

- Zapata, A.G., Alfaro, D., García-Ceca, J., Cejalvo, T., Tobajas, E., **Montero, S.** y Muñoz, J.J. **(2013)**. Eph/ephrin-mediated interactions govern many aspects of thymus biology. *ICCB 2012 proceedings of the 10th International Congress on Cell Biology*. July 25-28, 2012 – Rio de Janeiro (Brazil).

Eph/ephrin-B-mediated cell-to-cell interactions govern MTS20⁺ thymic epithelial cell development

Sara Montero-Herradón¹ · Javier García-Ceca¹ · Beatriz Sánchez del Collado¹ · David Alfaro¹ · Agustín G. Zapata¹ 

Accepted: 29 March 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Thymus development is a complex process in which cell-to-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells (TECs) are essential to allow a proper maturation of both thymic cell components. Although signals that control thymocyte development are well known, mechanisms governing TEC maturation are poorly understood, especially those that regulate the maturation of immature TEC populations during early fetal thymus development. In this study, we show that EphB2-deficient, EphB2LacZ and EphB3-deficient fetal thymuses present a lower number of cells and delayed maturation of DN cell subsets compared to WT values. Moreover, deficits in the production of chemokines, known to be involved in the lymphoid seeding into the thymus, contribute in decreased proportions of intrathymic T cell progenitors (PIRA/B⁺) in the mutant thymuses from early stages of development. These features correlate with increased proportions of MTS20⁺ cells but fewer MTS20⁻ cells from E13.5 onward in the deficient thymuses, suggesting a delayed development of the first epithelial cells. In addition, in vitro the lack of thymocytes or the blockade of Eph/ephrin-B-mediated cell-to-cell interactions between either thymocytes–TECs or TECs–TECs in E13.5 fetal thymic

lobes coursed with increased proportions of MTS20⁺ TECs. This confirms, for the first time, that the presence of CD45⁺ cells, corresponding at these stages to DN1 and DN2 cells, and Eph/ephrin-B-mediated heterotypic or homotypic cell interactions between thymocytes and TECs, or between TECs and themselves, contribute to the early maturation of MTS20⁺ TECs.

Keywords Eph/ephrins · Thymic epithelial cells · Thymus development · Thymocytes

Introduction

The thymus is a primary lymphoid organ where colonizing lymphoid progenitors mature into functional T cells that migrate to the secondary lymphoid organs (Blackburn and Manley 2004). For a proper thymocyte development, interactions between thymocytes and different subsets of TECs are necessary (van Ewijk et al. 1994). During this process, TECs also need different thymocyte-derived signals to functionally differentiate adequately (van Ewijk et al. 1994). Whereas signals mediated by TECs that control thymocyte development are well recognized, the thymocyte-derived signals that regulate TEC development are largely unknown.

Classically, TEC maturation has been divided into two stages, one independent of the presence of thymocytes, prior to the lymphoid colonization of the organ where homotypic TEC–TEC interactions predominate, and another later stage largely dependent on thymocyte–TEC interactions, although the thymocyte subsets involved remain to be conclusively determined (Blackburn and Manley 2004; Klug et al. 2002; Romano et al. 2013). In this sense, several authors have emphasized the importance of

Sara Montero-Herradón and Javier García-Ceca have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00418-016-1431-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Agustín G. Zapata
zapata@bio.ucm.es

¹ Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, C/José Antonio Novais 2, 28040 Madrid, Spain

EphB2 and EphB3 play an important role in the lymphoid seeding of murine adult thymus

David Alfaro,* Javier García-Ceca,* Desio A. Farias-de-Oliveira,[†] Eugenia Terra-Granado,^{†,‡} Sara Montero-Herradón,* Vinicius Cotta-de-Almeida,[†] Wilson Savino,[†] and Agustín Zapata*¹

*Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain; [†]Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; [‡]Pediatric Hematology and Oncology Program, Research Center, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil

RECEIVED NOVEMBER 28, 2014; REVISED FEBRUARY 2, 2015; ACCEPTED FEBRUARY 9, 2015. DOI: 10.1189/jlb.1H1114-568R

ABSTRACT

Adult thymuses lacking either ephrin type B receptor 2 (EphB2) or EphB3, or expressing a truncated form of EphB2, the forward signal-deficient EphB2LacZ, have low numbers of early thymic progenitors (ETPs) and are colonized in vivo by reduced numbers of injected bone marrow (BM) lineage-negative (Lin⁻) cells. Hematopoietic progenitors from these EphB mutants showed decreased capacities to colonize wild type (WT) thymuses compared with WT precursors, with EphB2^{-/-} cells exhibiting the greatest reduction. WT BM Lin⁻ cells also showed decreased colonizing capacity into mutant thymuses. The reduction was also more severe in EphB2^{-/-} host thymuses, with a less severe phenotype in the EphB2LacZ thymus. These results suggest a major function for forward signaling through EphB2 and, to a lesser extent, EphB3, in either colonizing progenitor cells or thymic stromal cells, for in vivo adult thymus recruitment. Furthermore, the altered expression of the molecules involved in thymic colonization that occurs in the mutant thymus correlates with the observed colonizing capacities of different mutant mice. Reduced production of CCL21 and CCL25 occurred in the thymus of the 3 EphB-deficient mice, but their expression, similar to that of P-selectin, on blood vessels, the method of entry of progenitor cells into the vascular thymus, only showed a significant reduction in EphB2^{-/-} and EphB3^{-/-} thymuses. Decreased migration into the EphB2^{-/-} thymuses correlated also with reduced expression of both ephrinB1 and ephrinB2, without changes in the EphB2LacZ thymuses. In the EphB3^{-/-} thymuses, only ephrinB1 expression appeared significantly diminished, confirming the relevance of forward signals mediated by the EphB2-ephrinB1 pair in cell recruitment into the adult thymus. *J. Leukoc. Biol.* 98: 883–896; 2015.

Introduction

The thymus, a lymphoid organ responsible for the functional maturation of T lymphocytes, does not contain self-renewing

lymphoid progenitors [1], and neither the nature of the progenitors colonizing the thymus nor the underlying molecular mechanisms that govern thymic cell seeding are conclusively known. These mechanisms seem to be distinct during fetal life, when lymphoid progenitors migrate from the fetal liver to an avascular thymic primordium, and in the adult thymus, whose progenitor cells are recruited from the bone marrow (BM) and reach the organ through the blood vessels of the cortico-medullary border [1]. Thus, it has been suggested that certain chemokines (CCL19, CCL21, CCL25, and CXCL12) and adhesion molecules (α 4, α 5, and α 6 integrins, CD44, ICAM-1, VCAM-1) play important roles in the migration to the fetal thymus [2–5]. In contrast, largely P-selectin, CLL25, CCR9, and CCR7 seem to be involved in the colonization of the adult thymus [6–8]. More recently, other molecules have been reported to be implicated in thymic cell recruitment, including the *Caenorhabditis elegans* Ced-5, mammalian DOCK180 and *Drosophila melanogaster* myoblast city (CDM) family of scaffolding members, dedicator of cytokinesis 2 (DOCK2) and DOCK180 [9], the polysialic acid [10] sphingosine-1 phosphate, which mediates progenitor cell egress from the BM [11], semaphorins, and ephrin receptors (Ephs) [12, 13].

Ephs and their ligands, ephrins, are the largest family of tyrosine kinase receptors present in animal cells. Both Ephs and ephrins are subdivided into 2 families, A and B, on the basis of their gene sequence similarities and ligand binding [14]. EphA, which includes 10 members, binds GPI-anchored ephrinA ligands (6 members), and EphB (6 members) interacts with ephrinB transmembrane proteins (3 members). Each Eph can bind several ephrins, and vice versa, and both receptors and ligands transmit intracellular signals, termed forward and reverse signals, respectively [14]. The system is, therefore, very plastic, exhibiting different affinities and expression patterns and determining numerous specific cell-to-cell interactions, which allow these molecules to play a role in a large number of cell functions in different biologic models. We, and others, have demonstrated the relevance of Eph/ephrins in thymus biology [15]. EphB2 and EphB3, the Eph kinases analyzed in the present

Abbreviations: BM = bone marrow, CLP = common lymphoid progenitor, ELP = early lymphoid progenitor, ETP = early thymic progenitor, HSC = hematopoietic stem cell, KO = knockout, Lin = lineage, MPP = multipotent progenitor, TEC = thymic epithelial cell, WT = wild type

1. Correspondence: José Antonio Novais 2, CP.28040, Madrid, Spain. E-mail: zapata@bio.ucm.es

study, and their main ligands, ephrinB1 and ephrinB2, are expressed in both developing thymocytes and thymic stromal cells [16]. EphB2- and EphB3-deficient thymuses show important alterations in the thymic epithelial cell (TEC) network, with modified distribution of the epithelial cell subsets, appearance of cytokeratin-free areas, and delayed maturation of TEC progenitors [17]. In contrast, only slight changes occur in thymocyte differentiation, which largely affects the double negative cell compartment [16]. However, when an imbalance of Eph/ephrin-mediated signals was “forced” in chimeric SCID mice, profound changes occurred in the proportions of distinct thymocyte subsets [18]. Likewise, the deletion of ephrinB1 and/or ephrinB2 in either thymocytes or TECs profoundly affects both TEC populations and thymic histologic features but has little effect on T-cell development [19, 20].

All deficient thymuses exhibited marked hypocellularity that appeared to be associated with increased apoptosis of both thymocytes [16] and TECs [21]. However, defects in the entry of lymphoid progenitors into the thymus could also be implicated, because these molecules have been reported to be involved in the cell migration of distinct immune cells [22–29]. Moreover, we demonstrated the participation of EphB2 in both thymic colonization by BM progenitor cells and in the intrathymic migration of developing T cells [13]. These studies were performed in vitro reconstitution assays using organ cultures of fetal thymic lobes, a model that, as mentioned, presents some important differences to the in vivo colonization of the adult thymus. Accordingly, we have extended these results in the present study, demonstrating a role for EphB2 and EphB3 in the in vivo colonization of the adult thymus by BM lineage-negative (Lin^-) progenitor cells and the relevance of the thymic microenvironment in the process.

MATERIALS AND METHODS

Mice

EphB-deficient mice, including EphB2 and EphB3 single mutants and EphB2LacZ mice generated in a CD1 background, were kindly provided by Dr. Mark Henkemeyer (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) to establish our own colony at the Complutense University Animal Care Facilities (Madrid, Spain). The EphB2LacZ mice express a truncated EphB2 molecule fused to β -galactosidase capable of stimulating ephrinB-expressing cells but unable to transmit EphB2 forward signals. EphB-mutant descendants from heterozygous parents were genotyped using PCR before being used in all the experiments. Wild type (WT) mice were EphB knockout (KO) littermates. After backcrossing for several generations, we established 3 subcolonies according to their CD45 haplotype expression (CD45.1, CD45.2, or CD45.1+2). EphB-deficient mice are viable and fertile and show no apparent phenotypic abnormalities. The litter sizes from the WT (EphB^{+/+}) pair matings were not different from those of the EphB^{-/-} pair litters. All mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at the animal housing facilities of the Complutense University of Madrid.

Cell suspensions, antibodies, and flow cytometry

BM cells and thymocytes were collected, as previously described [13]. In brief, the BM cells were obtained by flushing femur, tibia, and humerus with RPMI/10% FBS/5 mM EDTA and a subsequent Histopaque-1083 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) density gradient centrifugation. The cells were then incubated with the biotinylated Lin antibody cocktail (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), followed by a bead-conjugated anti-biotin antibody

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The BM cell suspensions were highly enriched in Lin^- cells by magnetic negative selection in an AutoMACS (Miltenyi Biotec), reaching a minimum purity of 95%. Thymocyte cell suspensions were prepared by gently pressing isolated thymuses. The cells were washed in cold medium (RPMI/5% FBS) and subsequently stained with specific antibodies.

The antibodies in the Lin cocktail (BD Pharmingen) included anti-B220 (clone RA3-6B2), anti-CD11b (M1/70), anti-Gr-1 (RB6-8C5), anti-Ter-119 (Ter-119), and anti-CD3 (145-2C11), either biotinylated or allophycocyanin (APC) conjugated. Additional antibodies used in the procedures were anti-CD4 purified (GK1.5), anti-CD25 (PC61), anti-CD44 (IM7), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CCR7 (4B12), anti-CCR9 (242503), anti-P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL1) (2PH1), anti-c-Kit (2B8), anti-Flt3 (A2F10), anti-IL-7 receptor subunit α (IL-7R α) (A7R34), and anti-Sca1 (D7). Antibodies were purchased from BD Pharmingen, BioLegend (San Diego, CA, USA), eBioscience (San Diego, CA, USA), or R&D Systems (Abingdon, UK) and conjugated with fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, peridinin chlorophyll protein-Cy5.5, or APC. Cell staining was performed with specific antibodies in PBS plus 1% FBS for 20 min, according to routine procedures. Flow cytometric analyses were performed using a FACSCalibur device (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with CellQuest software at the Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre (Complutense University). The analyses were performed using FCS Express software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

The early thymic progenitor (ETP) subpopulation was obtained by analyzing in the Lin APC-negative cell population, the percentage of c-Kit⁺ cells within the CD44⁺CD25⁻ subset. The hematopoietic stem cell (HSC), multipotent progenitor (MPP), early lymphoid progenitor (ELP), and common lymphoid progenitor (CLP) proportions were determined in BM cell suspensions to analyze the expression of Sca1 and c-Kit in different regions, defined according to their differential Flt3 and IL-7R α expression. For the analysis of the BM subsets expressing receptors for either chemokines or P-selectin, we used a similar procedure, in which anti-IL-7R α antibody was substituted with anti-CCR7, anti-CCR9, or anti-PSGL1 antibodies.

Intravenous transfers

Lin^- BM cells were prepared as described. For single i.v. transfers in all the assayed combinations, 10^6 Lin^- BM donor cells were injected i.v. in the tail of anesthetized 7–9-wk-old host mice, both with different CD45 haplotypes (CD45.1 or CD45.2). The mice were anesthetized with a mix of ketamine and xylazine by i.p. injection before the cell transfers were made, to avoid the mice experiencing any pain during the tail injection, according to institutional guidelines and approval by the Complutense University Ethical Committee for Animal Experimentation. For competitive colonization assays, a similar protocol was used: 10^6 Lin^- BM cells of each donor (WT mice [CD45.2] and EphB-deficient mice [CD45.1]) were mixed and injected in 7–9-wk-old heterozygous host mice (CD45.1+2). In addition, we tested, as previously reported [30, 31], the presence of donor cells in the BM of host mice, confirming that, apart from the thymus, they had also seeded in this organ. As previously described [32], to prevent rejection, the host mice were given 0.1 mg of anti-CD4 (GK1.5) antibody the day before BM cell transfer and every 4 d thereafter. Equivalent chimerism was observed between CD45.1 and CD45.2 donor cells in the BM (data not shown) of the recipient mice in the competition colonization experiments, confirming that rejection had not occurred. The host thymuses were analyzed using flow cytometry to detect CD45 chimerism, 3 wk after cell injection.

Immunofluorescence microscopy and tissue quantification

For immunofluorescence microscopy and tissue quantification, 6 μm -thick cryosections from either WT or EphB-deficient mice (aged 7–9 wk) were fixed in acetone for 10 min and air-dried. The slides were then incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies specific for either mouse P-selectin (dilution 1/50), CCL21 (1/100), CCL25 (1/25), ephrinB1 (1/20), ephrinB2 (1/20) (R&D Systems), panendothelial cell antigen (1/100) (MECA32,

BioLegend), and laminin (1/100) (Sigma-Aldrich). Alexa 488 anti-goat IgG, Alexa 488 anti-rabbit, and Alexa 594 anti-rat IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were used as secondary antibodies and incubated for 45 min. The sections were mounted in Antifade Prolong Gold (Molecular Probes) and photographed in a Zeiss Axioplan microscope (objectives: $10\times \infty/0.30$ Plan-Neofluar, $20\times \infty/0.50$ Plan-Neofluar, $40\times \infty/0.17$ Plan-Neofluar; Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a Spot2 digital camera. The expressed results are the mean values of a minimum of 10 nonoverlapping regions from different serial thymic sections of at least 4 different mice per genotype. The resultant images were quantified using Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). The quantitative fluorescence analyses were performed by calculating the number of specifically stained pixels, divided by the analyzed area in pixels and multiplied by 100 to obtain the percentage of stained pixels in every picture.

Electron microscopy

For electron microscopy, thymuses isolated from adult WT and EphB-deficient mice were fixed in 2.5% glutaraldehyde/0.1 M sodium cacodylate at 4°C for 3–5 h and embedded in Durcupan resin (Fluka AG, St. Gallen, Switzerland), as previously described [17]. Semithin sections were stained with toluidine blue for 5 min, dehydrated in 70–100% ethanol (5 min) (Panreac, Barcelona, Spain) and in xylene baths (5 min), mounted in DPEX (Panreac), and examined by light microscopy to identify the blood vessels in the thymic cortex and corticomedullary border for additional ultrastructural analysis. Ultrathin sections were double stained with uranyl acetate and lead citrate and studied in a JEOL 10.10 electron microscope (JEOL USA, Peabody, MA, USA) at the Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre of Complutense University (Madrid, Spain).

Statistical analysis

The data are presented as the mean \pm SD. The statistical significance of the data was assessed using Microsoft Excel 2010 (Redmond, WA, USA) using Student's *t* test and represented as NS ($P \geq 0.05$), $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.005$.

RESULTS

Lack of EphB2 or EphB3 affects the subpopulation of ETPs

To evaluate the possible contribution of colonizing T-cell precursors to the thymic hypocellularity observed in EphB-deficient thymuses [16], we first evaluated the ETP percentages in the thymus of adult EphB2 and EphB3 KO mice. In both EphB2- and EphB3-deficient mice, the percentages of ETP cells, defined as $\text{Lin}^- \text{cKit}^{\text{hi}} \text{CD44}^+ \text{CD25}^-$ cells [6, 33], decreased severely compared with those observed in the WT mice (Fig. 1). This reduction was close to 50%, highlighting the importance of EphB receptors for the complex processes that govern the arrival of lymphoid progenitors into the adult thymus. The proportions of ETP cells in EphB2LacZ mice, unable to generate forward signals in the EphB-expressing cells but able to activate the reverse signaling transmitted by the expressed ephrinB ligands, also decreased, compared with the control mice, but less importantly than in both EphB2- and EphB3-deficient thymuses (Fig. 1). These results indicated a role for reverse signaling in control of the ETP cell number but emphasized the relevance of the forward signals transmitted by the EphB receptors.

EphB2 signaling affects the development of early BM hematopoietic progenitor cells

Several events could be contributing to the observed reduction of ETP percentages in EphB KO mice, including the existence of

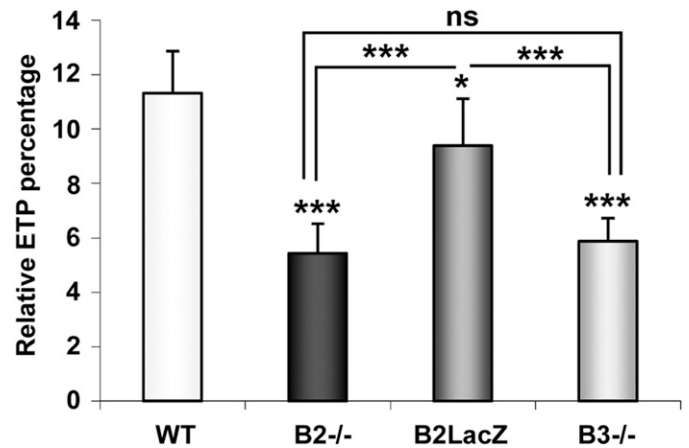


Figure 1. Reduced percentages of ETP cells in EphB-deficient mice. The percentages of ETP cells ($\text{Lin}^- \text{cKit}^{\text{hi}} \text{CD44}^+ \text{CD25}^-$ cells) were determined by FACS in adult WT and EphB-deficient thymuses, gating the $\text{CD44}^+ \text{CD25}^-$ cell population within the Lin^- cell subset and showing the values of c-Kit within the subset. The percentage of ETP cells was significantly lower in EphB2- or EphB3-deficient thymuses than in WT thymuses. Mice expressing a truncated form of EphB2, EphB2LacZ, showed increased values compared with those of EphB-deficient mice, but they did not reach the WT values. Data (mean \pm SD) are representative of ≥ 5 , sex-matched, 7–9-wk-old mice from each group in the indicated mouse strains. *P* values from Student's *t* test statistical analysis are indicated as NS ($P \geq 0.05$), $*P < 0.05$, and $***P < 0.005$.

a lower number of lymphoid progenitors with the capacity to colonize the EphB-deficient adult thymus, alterations in the BM exit of these progenitor cells, and in their trafficking into the adult thymus. We first studied the possible variations in the 4 main hematopoietic progenitor cell subsets defined by the expression of Sca1, c-Kit, IL-7R α , and Flt3 cell markers [1, 34], using Lin^- BM cell suspensions from either adult EphB-deficient or WT mice (Fig. 2).

We observed a significantly reduced proportion of the 4 assayed subsets in the EphB2 KO mice (Fig. 2). Remarkably, the lack of EphB3 did not affect any of the studied subsets. In the case of EphB2LacZ mice, the most primitive progenitor cell subsets, HSCs ($\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{Flt3}^- \text{IL-7R}\alpha^-$ cells) and MPPs ($\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{Flt3}^+ \text{IL-7R}\alpha^-$ cells) underwent significant reductions, just as found in EphB2 KO mice but not in the ELPs ($\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{Flt3}^+ \text{IL-7R}\alpha^+$ cells) and CLPs ($\text{Lin}^- \text{Sca1}^{\text{lo}} \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{Flt3}^+ \text{IL-7R}\alpha^+$ cells). These results again suggested the relevance of EphB2 in the development of hematopoietic progenitors in the mouse BM.

Thymus colonization capacity is impaired in the EphB-deficient BM precursor cells

Together with changes in the proportions of BM hematopoietic progenitors, the low numbers of ETPs found in the EphB KO thymuses could also have resulted from defects in the lymphoid progenitors able to colonize the thymus: defects in their numbers or in their ability to reach the thymus parenchyma. Because different evidence has suggested that lymphoid progenitors capable of colonizing the thymus express specific receptors that allow their attraction to the thymic parenchyma by chemokines and other molecules [1], we examined the expression of CCR7,

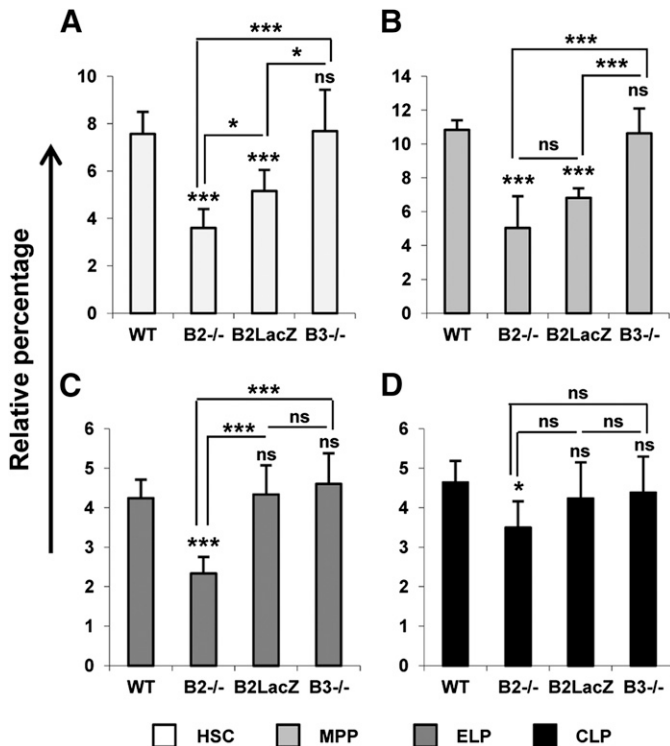


Figure 2. Percentages of BM progenitor cell subpopulations in WT and EphB-deficient mice. Hematopoietic progenitor cell subsets were defined by the expression of Sca1, c-Kit, Flt3, and IL-7R α cell markers: HSC (A), MPP (B), ELP (C), and CLP (D). The percentages of all tested progenitor cells were significantly lower in the EphB2^{-/-} BM than in the WT BM, and the EphB3^{-/-} mice showed similar values to those from WT BM (A–D). The EphB2LacZ mice presented with a significantly lower percentage of the earliest hematopoietic precursor cells, HSC and MPP (A and B), but not those of ELP and CLP (C and D). Data (mean \pm SD) are representative of 5 sex-matched mice from each group in the indicated mouse strains. *P* values from Student's *t* test statistical analysis are indicated as NS (*P* \geq 0.05), **P* < 0.05, and ****P* < 0.005.

CCR9, and PSGL1 in the HSC, MPP, ELP, and CLP subsets of adult BM. MPPs and ELPs were studied as a single cell population. We did not find statistically significant variations in the percentages of EphB-deficient progenitor cells expressing CCR7, CCR9, and PSGL1 compared with their WT counterparts (Fig. 3).

Next, we performed *in vivo* colonization assays in which we *i.v.* injected 10⁶ Lin⁻ BM cells isolated from either EphB-deficient or WT mice to test their capacity to colonize WT host thymuses. Donor (CD45.1) and host (CD45.2) mice expressing different CD45 haplotypes were used to discriminate the exogenous and endogenous thymic cells present in the host thymus 3 wk after the cell injections. As previously described [8, 31, 32], in all colonization experiments, the host mice were treated with anti-CD4 antibody to prevent cell donor rejection. Our results indicated that WT thymuses contained lower proportions of the injected EphB-deficient cells than WT cells (Fig. 4A). The proportions were particularly low in the case of mice receiving EphB2 KO Lin⁻ cells, showing significant differences, not only with respect to the control values, but also compared with WT thymuses colonized by either EphB3 or EphB2LacZ cells, whose

proportions were also lower than those of WT Lin⁻ cells (Fig. 4A). No differences were found between mice receiving EphB2LacZ Lin⁻ cells and those injected with EphB3-deficient mice (Fig. 4A).

In addition, we tested the ability of these EphB-deficient precursors to reach the WT thymuses in competitive conditions with WT cells injected at the same time (Fig. 4B and C). For this purpose, we injected the same number of Lin⁻ BM cells isolated from either WT mice (CD45.2) or EphB-deficient mice (CD45.1) into heterozygous WT host mice (CD45.1 plus CD45.2). In these experimental conditions, we could distinguish endogenous WT thymocytes from those derived from either WT or EphB-deficient Lin⁻ cells. The injected WT cells colonized the WT host thymus normally, but all types of EphB-deficient cells studied appeared in significantly lower proportions than the injected WT Lin⁻ cells (Fig. 4B and C). Nevertheless, the reduction in migrating mutant cell numbers was more severe, compared with the WT donor cells, in experiments performed in competitive conditions (Fig. 4B and C) than when Lin⁻ BM cells from either WT or mutant mice were injected alone (Fig. 4A).

Migration of WT BM progenitor cells into EphB-deficient thymuses is profoundly reduced

The relevance of a thymic microenvironment for BM progenitor cell colonization previously claimed [6, 13, 35] was evidenced after *i.v.* injection of 10⁶ WT cell progenitors in EphB-deficient mice. Three weeks later, the number of WT BM Lin⁻ donor cells was significantly lower in the 3 mutant thymuses than in the WT ones (Fig. 5). Although, the 3 EphB-deficient thymuses showed significantly reduced proportions of WT cells, the reduction was particularly severe in the EphB2-deficient thymuses. In contrast, EphB2LacZ mice showed significantly greater proportions of colonizing WT cells than those found in both EphB2- and EphB3-deficient mice, although the values did not reach those observed when WT thymuses were used as hosts in the experiments (Fig. 5). These results suggest the importance of ephrin reverse signaling for thymic colonization and the need for forward signals transmitted through EphB2 and EphB3 receptors.

When we compared both colonization assays, the reduction in thymic immigrant cells was higher in the EphB3^{-/-} thymuses receiving WT donor progenitors (Fig. 5) than in the WT thymuses receiving EphB3^{-/-} progenitor cells (Fig. 4A). In contrast, the proportions of intrathymic donor cells in EphB2LacZ thymuses receiving WT progenitors (Fig. 5) were greater than those observed in WT thymuses colonized by EphB2LacZ precursor cells (Fig. 4A). In the EphB2^{-/-} thymuses that received WT progenitors (Fig. 5), the proportion of intrathymic donor cells was similar to that of WT thymuses colonized by EphB2^{-/-} precursor cells (Fig. 4A), presumably because the donor cell frequency was severely reduced in both cases.

To further evaluate the relative relevance of donor BM progenitors and host stroma, we analyzed thymic colonization, combining differentially EphB-deficient BM progenitor cells and WT and mutant thymic stromas (Fig. 6). To achieve this, we selected and crossed for several generations CD45.2 EphB KO mice to generate a new mouse colony that allowed us to

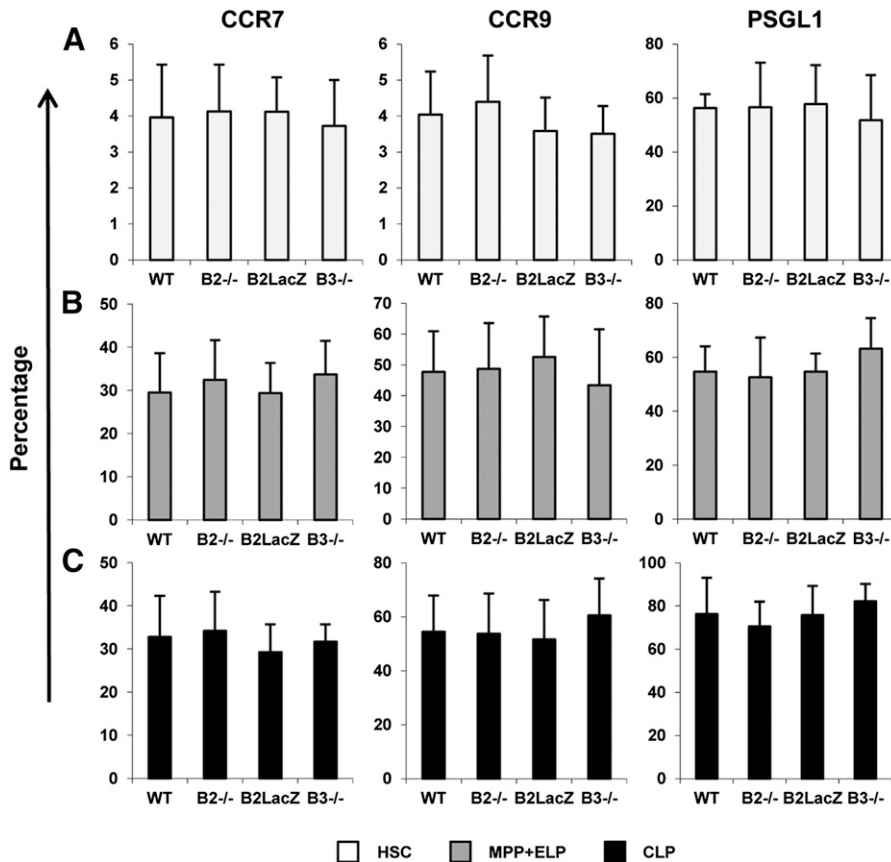


Figure 3. No changes were detected in the proportions of chemokine or P-selectin receptor-expressing progenitor cells of EphB-deficient mice. The expression of CCR7, CCR9, and PSGL1 was analyzed by FACS in 3 groups of BM progenitors defined as (A) HSC (Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺Flt3⁻), (B) MPP and ELP (Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺Flt3⁺), and (C) CLP (Lin⁻Sca1^{-/low}c-Kit^{-/low}Flt3⁺). No significant differences were observed ($P \geq 0.05$) between populations isolated from WT and EphB-deficient mice. Data are representative of 4 independent experiments (mean \pm sd). The mice were aged 7–9 wk and sex matched. Student's *t* test statistical analysis was performed.

distinguish donor vs. host cells when both lacked EphB receptor expression. We then tested the *in vivo* capacity of different EphB-deficient precursors to colonize in different altered EphB microenvironments (Fig. 6).

EphB2^{-/-} progenitors showed altered thymic colonization into all the assayed EphB-deficient thymuses compared with their capacity to colonize WT thymuses (Fig. 6A). The lowest levels of EphB2-deficient thymic cells occurred in both EphB2 KO and EphB2LacZ thymuses. In contrast, EphB3-deficient thymuses were colonized slightly better (Fig. 6A). Although in all conditions, the EphB-deficient stromas were more poorly colonized by any mutant BM progenitors than by WT ones, the situation when EphB2LacZ (Fig. 6B) or EphB3 (Fig. 6C) progenitors were injected in EphB2-deficient thymuses was again particularly severe. Accordingly, EphB2-deficient stroma exhibited the lowest capacity to be colonized by any of the 4 types of Lin⁻ BM precursor cells tested. Both EphB2LacZ and EphB3-deficient thymuses showed a lower capacity to be colonized than did the WT thymuses; however, they contained significantly greater numbers of donor cells than did the EphB2-deficient host thymuses.

EphB-deficient mice present defective expression of P-selectin and chemokines involved in progenitor cell recruitment into the thymus

Because in other experimental models, decreased expression of homing molecules has been accounted for by decreased thymic

progenitor receptivity [36], we studied immunohistochemically the expression of P-selectin (Fig. 7) and chemokines CCL12 and CCL25 (Fig. 8) in the thymus of adult WT and EphB-mutant mice, quantifying their values using software-based analysis. Our results showed a very significant reduction in P-selectin expression compared with the WT thymus in both EphB2- and EphB3-deficient thymuses, but not in the EphB2LacZ mice (Fig. 7A and B). Regarding the chemokines, in both control and mutant thymuses, CCL21 was largely expressed in the thymic medulla, and CCL25 appeared in both the cortex and the medulla (Fig. 8). In addition, all mutant thymuses showed significantly reduced expression of CCL21 and CCL25 compared with the control thymuses, with EphB2-deficient thymuses exhibiting the most severe reduction, particularly of CCL21 expression (Fig. 8A).

We analyzed the structure of the thymic blood vessels (Fig. 9), because progenitor cell migration into the adult thymus occurs through them, and it has been reported that mice lacking EphB2 or EphB3 have defective vasculogenesis [37]. Furthermore, we evaluated the expression of CCL21 and CCL25 (Fig. 8), which attract CCR7⁺ and CCR9⁺ cells, respectively, into the thymus [1], and of ephrinB1 and ephrinB2, the main EphB2 and EphB3 ligands, which mediate the EphB-mediated lymphoid progenitor transmigration (Fig. 10). Using laminin expression as a marker of the thymic vasculature pattern, we observed that the blood vessels of the 3 mutant thymuses studied appeared enlarged and their walls thickened compared with those of the WT thymuses (Fig. 9A–D). By electron microscopy, the blood vessels of the mutant

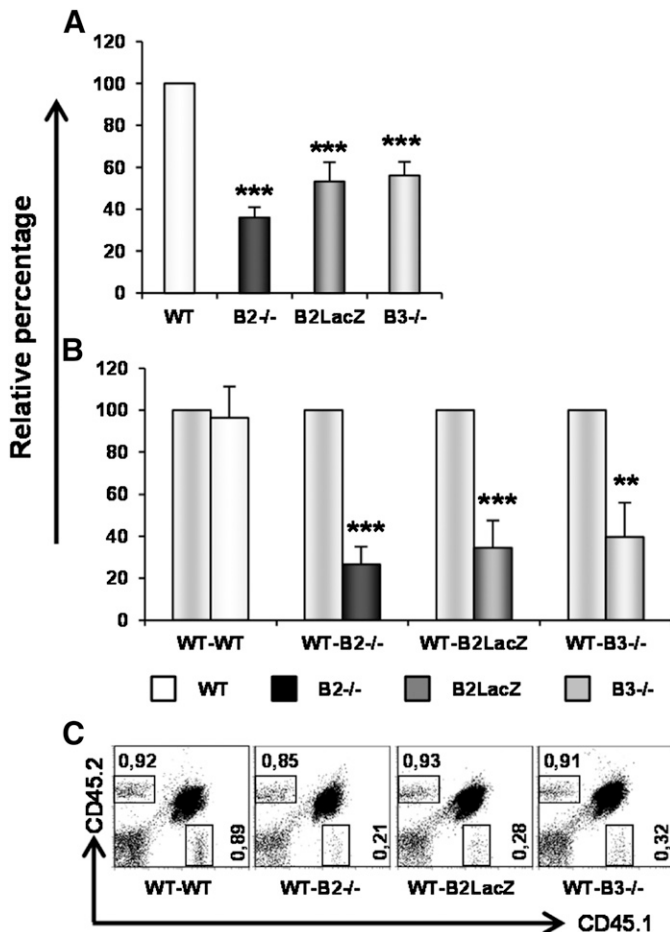


Figure 4. EphB-deficient Lin⁻ BM cells colonized the WT thymuses poorly. (A) At 3 wk after i.v. injection of BM Lin⁻ cells into WT host mice, the thymuses were analyzed to determine the relative proportions of donor CD45.1⁺ cells and endogenous host CD45.2⁺ thymic cells. Lin⁻ progenitor cells derived from EphB-deficient BM showed a diminished capacity to enter the thymus. (B) Competitive assays were also performed in which BM Lin⁻ cells from WT and EphB-deficient mice were injected i.v. in the same WT mouse. Newly EphB-deficient progenitors colonized the host thymus less effectively than did the WT cells. Data are representative of 4 independent experiments (mean \pm SD) with 7–9-wk-old, sex-matched mice. In each experiment, the relative percentages with respect to the WT values are shown. *P* values from Student's *t* test statistical analysis are indicated as NS ($P \geq 0.05$), ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$. (C) FACS analysis of WT host thymuses (CD45.1 plus CD45.2) after i.v. transfers of WT (CD45.2) and EphB-deficient mice BM Lin⁻ cells (CD45.1) in competitive adoptive colonization assays. Representative plots are shown.

thymic cortex showed enlarged perivascular spaces that did not appear in the WT thymus (Fig. 9E–H). In addition, high-endothelial vessels of the corticomedullary area of the mutant thymuses showed important reinforcements of their basal membrane that could hinder lymphoid progenitor migration (Fig. 9I–N).

In contrast, in both mutant and WT thymuses, association of CCL21 expression and MECA32⁺ vascular endothelia was clearly evidenced (Fig. 8C–F). However, CCL25 expression occurred more frequently surrounding the blood vessels (Fig. 8G–J). The

quantitative study confirmed a significant decrease in CCL12/MECA32 and CCL25/MECA32 staining in both EphB2- and EphB3-deficient thymuses but not in the EphB2LacZ ones (Fig. 8B). We have also reported that ephrinB expression remained in the thymuses of mice deficient in their EphB2 and EphB3 receptors [16] (Fig. 10), but the quantification of ephrinB staining associated with MECA32⁺ blood vessels (Fig. 10B–I) demonstrated a significant decrease in ephrinB expression in the thymic vascular endothelia of EphB2- and EphB3-deficient mice but not in the EphB2LacZ ones (Fig. 10A). EphrinB2 expression only decreased significantly in the EphB2^{-/-} thymic blood vessels and not in those of EphB3^{-/-} or EphB2LacZ thymuses (Fig. 10A).

DISCUSSION

The trafficking of lymphoid progenitors into the thymus is key to understanding T-cell maturation but has yet to be definitively resolved [1]. Together with the assumed role of chemokines, adhesion molecules, and P-selectin in the process [2, 4, 6–8], our present results have demonstrated the relevance of EphB2 and EphB3 in *in vivo* progenitor cell recruitment into the adult thymus, confirming our own previous results obtained in an *in vitro* reconstituted assay using organ cultures of fetal thymic lobes [13].

Ephs and ephrins have been implicated in cell migration in various systems [38], although the *in vivo* studies are few and have been performed in experimental models very distinct to those we analyzed in the present study. In this context, *in vivo* infusion of preclustered EphB2-Fc or ephrinB2 proteins in the subventricular zone disturbs the migration of neuronal precursors [39, 40], and disruption of Eph/ephrin signaling reduces

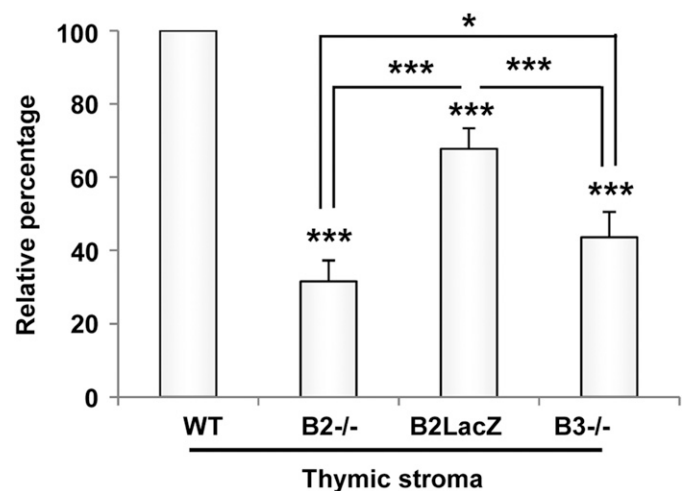


Figure 5. WT BM progenitors show impeded colonization of EphB-deficient thymuses. At 3 weeks after WT BM progenitor cells were injected i.v. in adult EphB KO hosts, a significant reduction was seen in WT cell proportions in the mutant host thymuses; particularly low percentages occurred in EphB2 KO thymuses, with less drastic effects in EphB2LacZ thymuses. Values shown are relative percentages of WT values. Data are representative of 4 independent experiments (mean \pm SD). Mice were sex matched and 7–9 wk old. Student's *t* test statistical analysis was done: * $P < 0.05$ and *** $P < 0.005$.

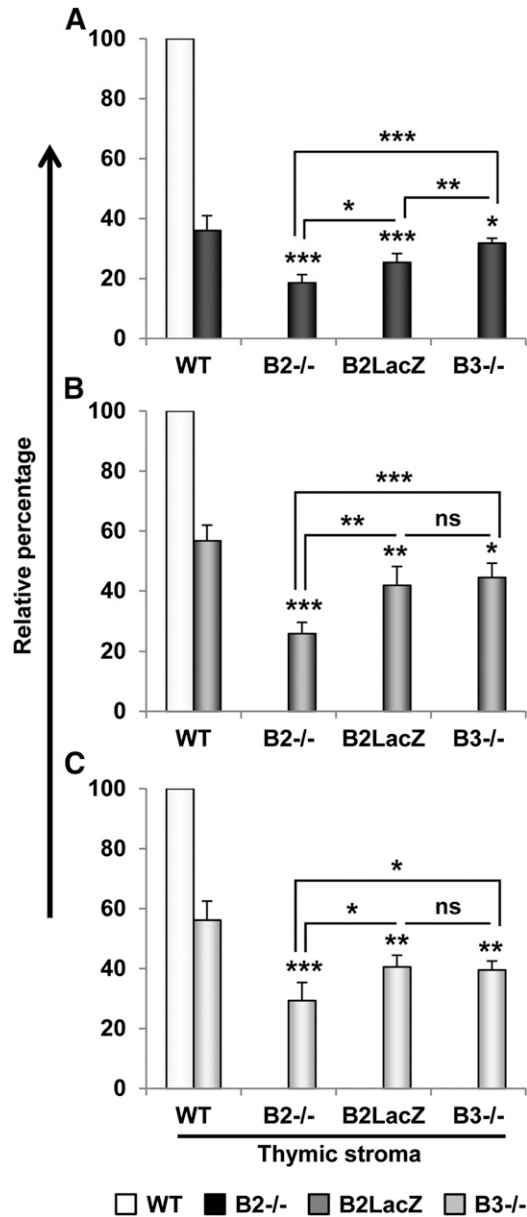


Figure 6. EphB-deficient BM progenitor cells colonize WT and EphB mutant thymuses with different efficiency. EphB2^{-/-} (A), EphB2LacZ (B), and EphB3^{-/-} (C) BM progenitor cells were injected i.v. in either WT or EphB-deficient mice, and their intrathymic presence was evaluated by FACS 3 weeks later. In all cases, the EphB2^{-/-} thymic stroma showed the lowest numbers of WT or EphB-deficient cells. Both EphB2LacZ and EphB3^{-/-} thymuses showed similar homing capability, but always lower than that of WT thymuses, except for EphB2^{-/-} progenitor cells that colonized EphB2LacZ stroma slightly worse than EphB3^{-/-} thymuses. Data shown are related to the percentage of WT colonizing progenitors into WT thymuses (100%) (first column). Data (mean \pm sd) are representative of 4 sex-matched mice in each group in the indicated mouse strains. *P* values from Student's *t* test statistical analysis are indicated as NS (*P* \geq 0.05), **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.005.

the efficiency of Cajal-Retzius cell dispersion in the cortex induced by CXCL12 produced by meninges [41]. Furthermore, EphA2 modulates the accumulation of T cells and dendritic cells in the lungs of EphA2^{-/-} mice injected with *Mycobacterium*

tuberculosis [42], and ephrinA reverse signaling promotes the migration of cortical interneurons from the medial ganglionic eminence. In EphA4^{-/-} mice and ephrinA2-deficient mice, interneuronal migration is delayed [43].

The reduced numbers of both ETPs and injected migrating hematopoietic cells into the adult thymus can be attributed to several processes. Thus, our study found lower numbers of hematopoietic progenitor cells in the BM of EphB2 KO and EphB2LacZ mice than in the WT BM, defects in the migration into the thymus of both WT and mutant progenitor cells, and altered expression of molecules involved in both thymic recruitment and transmigration processes throughout the blood vessels in the mutant thymuses.

EphB2- but not EphB3-deficient mice exhibited reduced proportions of the 4 BM hematopoietic cell subsets studied

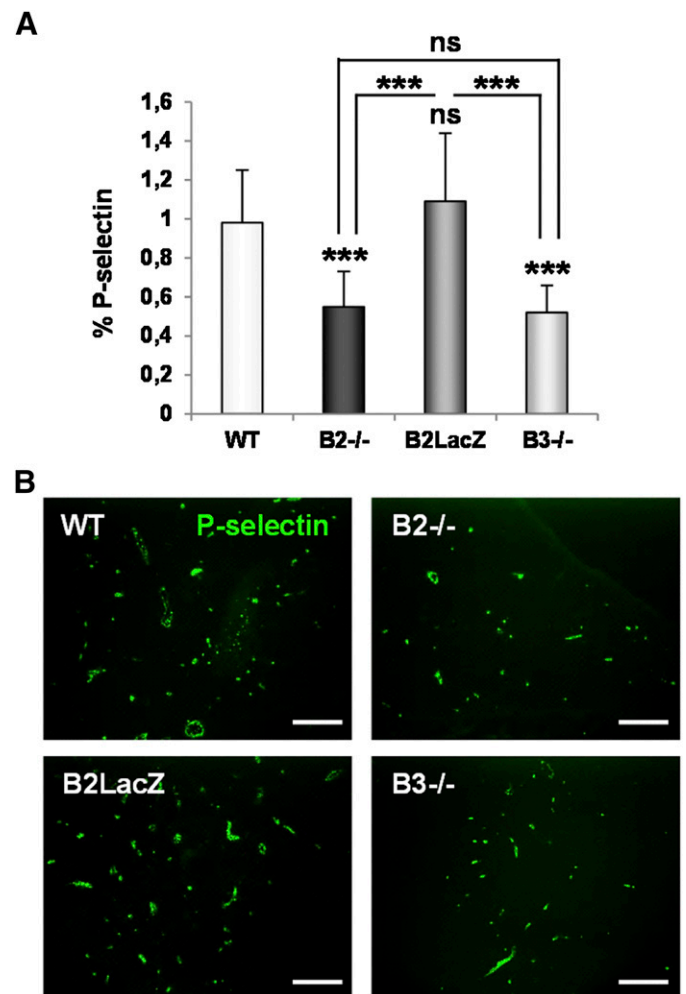


Figure 7. Reduced expression of P-selectin in both EphB2^{-/-} and EphB3^{-/-} thymuses but not in EphB2LacZ ones. (A) The analysis of serial thymic cryosections of the different EphB-deficient mice showed a lower expression of P-selectin in both EphB2- and EphB3-deficient mice. In contrast, the EphB2LacZ thymuses showed P-selectin expression similar to that of WT mice. (B) P-selectin expression in representative thymic sections of WT and EphB-deficient mice are shown. *P* values from Student's *t* test statistical analysis are indicated as NS (*P* \geq 0.05) and ****P* < 0.005. Scale bars, 200 μ m.

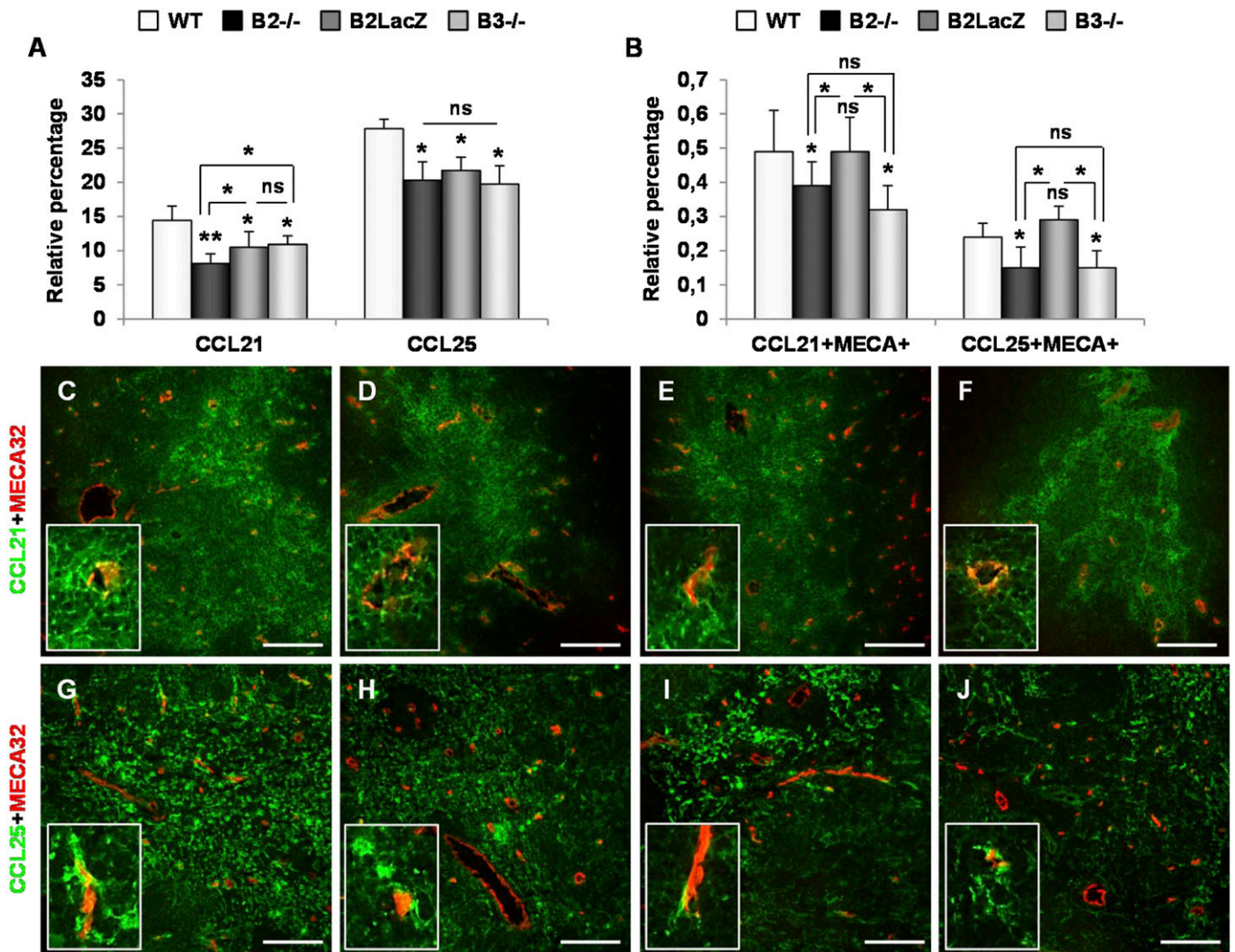


Figure 8. Chemokines involved in progenitor cell recruitment into the thymus are less expressed in EphB KO thymuses. (A) Data obtained from the analysis of successive thymic cryosections stained for either CCL21 or CCL25 showed lower expression of both molecules throughout the thymic stroma in all EphB-mutants studied compared with the WT thymuses. (B) When this analysis only referred to chemokine expression at the MECA32⁺ vascular endothelia, the expression of both CCL21 and CCL25 did not exhibit differences in EphB2LacZ thymuses compared with the WT thymuses but decreased significantly in both EphB2- and EphB3-deficient mice. (C–F) Representative thymic sections showing CCL21 expression (green) and MECA32 endothelial cells (red) in WT (C), EphB2^{-/-} (D), EphB2LacZ (E), and EphB3^{-/-} (F) thymuses. (G–J) Representative thymic sections showing CCL25 expression (green) and MECA32 endothelial cells (red) in WT (G), EphB2^{-/-} (H), EphB2LacZ (I), and EphB3^{-/-} (J) thymuses. In each case, inserts show the expression of CCL21 or CCL25 associated with MECA32⁺ blood vessels. *P* values from Student's *t* test statistical analysis are indicated as NS (*P* ≥ 0.05), **P* < 0.05, and ***P* < 0.01. Scale bars, 100 μm.

(HSCs, MPPs, ELPs, and CLPs) compared with WT mice. In contrast, EphB2LacZ mice only showed a diminished frequency of the most primitive stages, HSCs and MPPs. Thus, differences between the WT and mutant hematopoietic cell subsets gradually decreased in the more mature stages, confirming our previous results [13]. No changes were found in the proportions of EphB3^{-/-} hematopoietic progenitor cells. As discussed later in the present report, the phenotypes of EphB2- and EphB3-deficient mice are not similar, with EphB2 KO mice exhibiting the most severe alterations. However, how the different hematopoietic progenitor cells contribute to thymic cell recruitment is a matter for discussion. As described, only hematopoietic progenitors that express CCR7, CCR9, and PSGL1

seem to be capable of efficiently colonizing the adult thymus [6, 8]. The proportion of these cells in the different BM cell subsets studied did not undergo significant changes when WT and mutant mice were compared. Nevertheless, other studies have reported that more primitive cells than CLPs, such as HSCs [44], lymphoid-primed multipotent progenitor (including in the subset analyzed in our study as MPPs plus ELPs) [45], or MPPs [31] retain the capacity to colonize the thymus. Because these studies have used different cell markers to identify the hematopoietic precursor subsets, the precise identity of the cells arriving into the thymus remains controversial. Presumably, all the progenitors identified in the adult BM have T-cell development potential, but only some, more restricted, subsets move from the peripheral

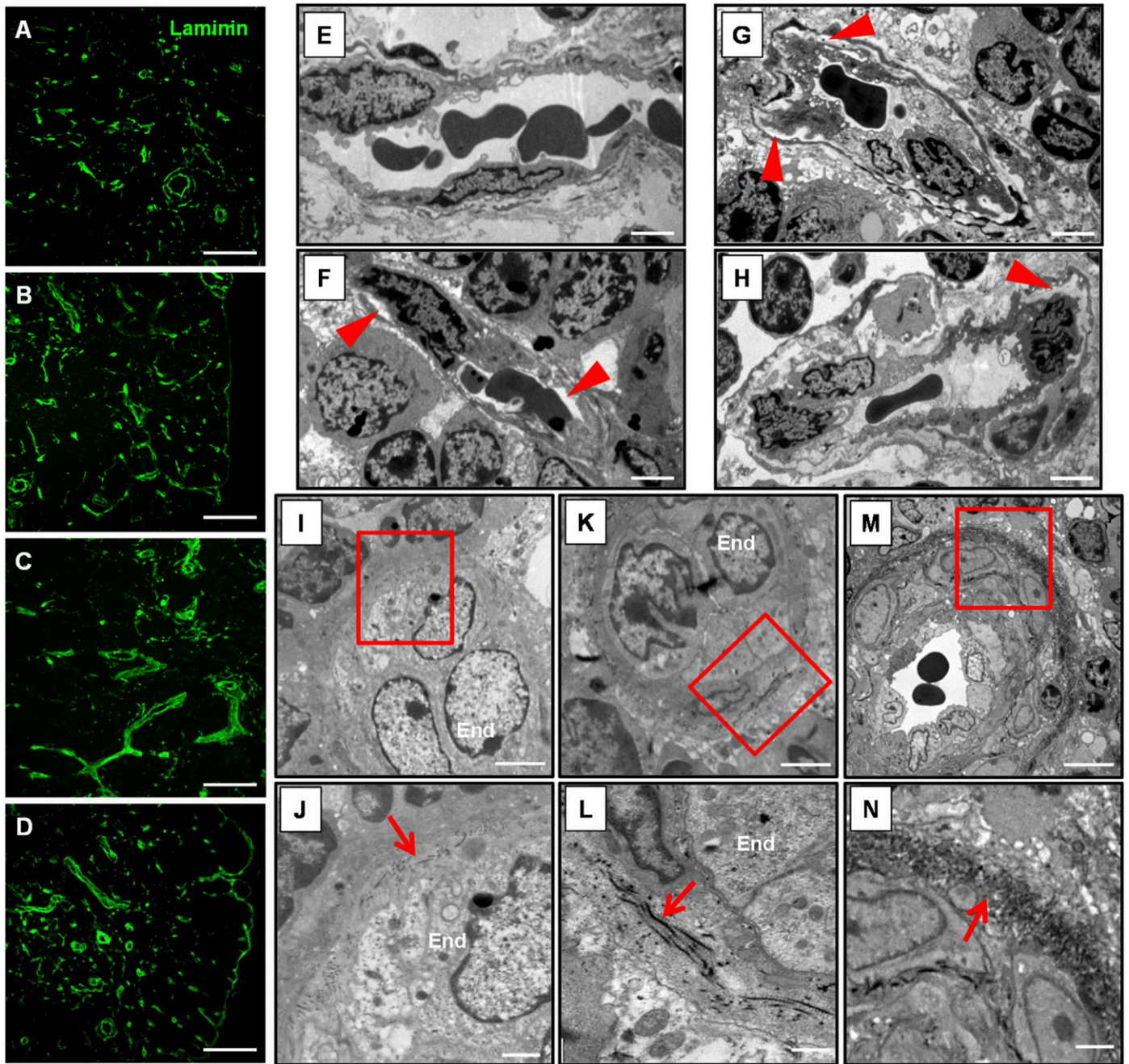


Figure 9. EphB-deficient mice showed morphologic changes in thymic blood vessels. (A–D) Blood vessels were identified by laminin expression. Note the increased staining occurring in EphB2^{-/-} (B), EphB2LacZ (C), EphB3^{-/-} (D) thymuses compared with WT ones (A). Scale bars, 200 μm. (E–H) Blood vessels of the thymic cortex examined by electron microscopy exhibited empty and enlarged spaces (arrowheads) between endothelial cells and surrounding cells, forming the vascular walls in EphB2^{-/-} (F), EphB2LacZ (G), and EphB3^{-/-} (H) compared with the condition of the WT cortical capillaries (E). Scale bars, 2 μm. (I–N) High endothelial venules (HEV) of EphB2^{-/-} (K), EphB2LacZ (M) appear reinforced by enlarged layers of connective tissue (squares), showed (arrows) at higher magnifications in parts (L) and (N), respectively, compared with WT HEV (I and J). End, endothelial cells. Scale bars, 3 μm (I and K), 5 μm (M), and 1 μm (J, L, and N).

blood and enter the thymus [1]. Accordingly, decreased proportions of HSCs and MPPs found in both EphB2^{-/-} and EphB2LacZ mice could also be contributing to the reduced migration into the thymus observed in these mutants.

Apart from the numbers of presumptive migrating cells from the BM to the thymus, it is known that different factors, including

G-CSF, β -adrenergic agonists, and CXCR4 antagonists, modulate the exit of blood cell progenitors to the peripheral blood [46]. Some data have indicated that Eph/ephrins could also be involved in these processes. We have observed that human mesenchymal stem cells, a component of BM stroma, strongly express EphB2, EphB4, ephrinB1, and ephrinB2 and a short

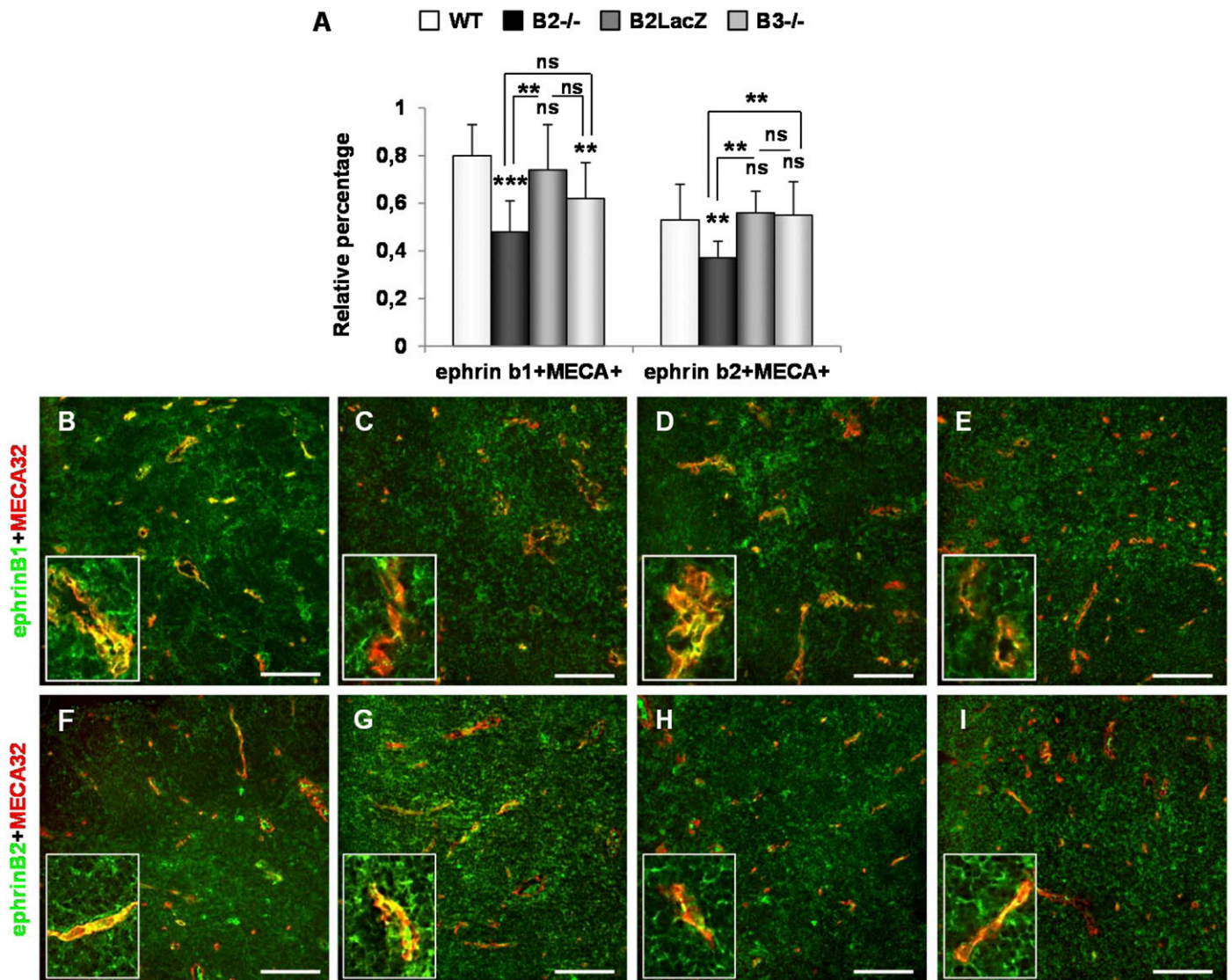


Figure 10. Expression of ephrinB1 and ephrinB2 in thymic blood vessels changes in EphB-deficient thymuses. (A) Lower expression of ephrinB1 in the thymic vasculature of both EphB2^{-/-} and EphB3^{-/-} mice but not in EphB2LacZ mice. In the case of ephrinB2, this reduction was only significant in EphB2-deficient mice; other mutants had values similar to those in WT. (B–E) Representative thymic sections showing ephrinB1 expression (green) and MECA32 endothelial cells (red) in WT (B), EphB2^{-/-} (C), EphB2LacZ (D), and EphB3^{-/-} (E) thymuses. (F–I) Representative thymic sections showing ephrinB2 expression (green) and MECA32 endothelial cells (red) in WT (F), EphB2^{-/-} (G), EphB2LacZ (H), and EphB3^{-/-} (I) thymuses. In each case, inserts show the expression of ephrinB1 or ephrinB2 associated with MECA32⁺ blood vessels. *P* values from Student's *t* test statistical analysis are indicated as NS (*P* ≥ 0.05), ***P* < 0.01, and ****P* < 0.005. Scale bars, 100 μm.

EphA3 isoform and ephrinA4 (data not shown), confirming previous results [47–49]. In addition, sorted murine Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) cells express EphA2 and EphA3 [50], and murine and human long-term HSCs express ephrinB2 [51]. Although this was not analyzed in the present study, Eph–ephrin interactions between hematopoietic progenitor cells and stromal components could be involved in the mobilization of the former, and alterations in mutant mice would contribute to changes in migration toward the thymus. Thus, EphB4⁺ hematopoietic precursor cell migration within the BM is inhibited by ephrinB2⁺ stromal cells. In addition, BM Stro-1⁺ mesenchymal stem cells stimulated by ephrinB1-Fc proteins show increased in vitro

migration and EphB2 silencing alters the migratory properties [47]. Also, EphA3-Fc protein treatment mobilizes primitive hematopoietic progenitors in the peripheral blood [50]. In the BM, just as in other systems, Eph-mediated cell mobilization could be mediated through CXCL12. Ephs interact with CXCR4, the CXCL12 receptor, on the cell surface [52], the ephrinB1-Fc fusion protein stimulates the CXCL12-dependent migration of peripheral blood lymphocytes in a dose-dependent manner [26] and Eph–ephrin interactions inhibit the CXCL12-mediated chemotaxis of cerebellar granular cells [53].

The thymic colonization performed by EphB-deficient progenitors in WT adult thymuses and that of WT precursors

into EphB-deficient mice follows different rules, the comparative analysis of which provides interesting information on the regulatory mechanisms exerted by EphB in the lymphoid precursor colonization of the adult thymus. Mutant BM progenitor cells show a decreased capacity to colonize WT thymuses (Fig. 4A), and this finding was more evident when mutant cells were injected competitively, together with WT Lin⁻ BM cells (Fig. 4B). Such a phenomenon was previously observed in other models deficient in homing molecules, such as CCR7/CCR9 double KO mice [30]. In the 3 conditions studied, progenitor recruitment was importantly reduced, most severely in the case of EphB2^{-/-} progenitors. The lack of EphB2 forward signaling and, to a lesser degree, that of EphB3 forward signaling are determinant to explain these results, indicating the relevance of EphB2, rather than EphB3, forward signals for progenitor cell recruitment to adult thymus. In the case of EphB2LacZ, the occurrence of a reverse signal presumably transmitted to thymic endothelial cells improved, but did not totally recover, colonization to WT levels. Remarkably, our previous studies using an *in vitro* reconstituting assay in fetal thymic lobes demonstrated that in these experimental conditions the reverse signal transmitted by ephrinB expressed in fetal thymic stroma was sufficient for recovering thymic progenitor settling [13]. These results, therefore, suggest that reverse signaling exerted on endothelial cells favors the lymphoid settling to thymus and confirm that fetal and adult thymic colonization (and *in vivo* and *in vitro* assays) are not equivalent, as previously reported [2].

WT Lin⁻ BM cells, assayed to *in vivo* colonize mutant thymuses, also showed decreased seeding capacity, particularly significant in EphB2-deficient thymus (Fig. 5). This finding demonstrates the relevance of the thymic microenvironment in governing precursor cell recruitment, supporting other previous results [6, 35]. In these assays, the expression of EphB2LacZ in the thymic cells also provides important improvement in WT progenitor cell recruitment, although the differences remain statistically significant compared with the WT thymuses. In this case, the lack of EphB forward signals in thymic endothelial cells could explain the reduced colonization of the thymus. In contrast, reverse signals transmitted to ephrinB-expressing progenitor cells improved, but did not totally rescue, the colonization capacity of WT BM cells. Therefore, forward signaling in either progenitor cells or thymic stroma is key for *in vivo* lymphoid recruitment into the thymus. In contrast, ephrinB reverse signaling appears to be secondary. However, the reduction in intrathymic migrating capacity is more severe when mutant cells are injected in WT thymuses than when mutant mice receive WT BM progenitor cells. These data suggest that the lack of forward signals in circulating progenitor cells is more important than their absence in the thymic stroma.

Our studies on the colonization capacity of EphB-deficient Lin⁻ BM cells to WT or EphB-deficient thymuses (Fig. 6) confirmed our conclusions on the relevance of distinct Eph/ephrinB signals for the process. EphB2^{-/-} progenitor cells exhibited the lowest colonization to any tested thymus and were particularly low when injected into EphB2-deficient mice. In this condition, both EphB2 forward and reverse signaling were abrogated in the progenitor cells and thymic endothelia. Any

mutant progenitor cell exhibits the lowest colonization capacity injected in EphB2 KO mice. Both findings have confirmed the relevance of EphB2 expressed in both progenitors and thymic endothelial cells for lymphoid recruitment to the thymus. EphB3 and EphB2LacZ thymuses showed reduced colonization but significantly greater than that found in EphB2^{-/-} mice. In addition, both types of deficient progenitors colonized EphB2LacZ and EphB3 mice similarly. However, it is especially remarkable that the lack of EphB3 receptors, which results in defective signaling quite similar to that caused by the absence of EphB2 [54], courses with a significantly better capacity for progenitor cell seeding to the thymus, confirming its negligible involvement in the process. As indicated, EphB2- and EphB3-deficient thymuses are not equal, because, in general, the phenotype observed in EphB2^{-/-} mice is more severe [17]. In addition, a signaling imbalance between these 2 molecules induces different phenotypes [18]. Chimaeras established with EphB2^{-/-} progenitor cells injected in SCID mice showed an almost total blockade of thymocyte development at the double negative stage. However, in similar conditions, EphB3^{-/-} generated double-positive cells, although at low proportions [18]. Although the pathways activated by these molecules are, in general, common, the system exhibits a certain specificity dependent on the cell type, the context of cell stimulation, and interactions with other signaling systems [54].

In contrast, when reverse signaling is induced by EphB2LacZ progenitor cells in EphB2^{-/-} thymic endothelial cells, a mild recovery of colonization occurs that is slightly greater when the signal occurs in EphB3^{-/-} thymic cells. Even with the occurrence of reverse signaling in both progenitor and thymic cells (EphB2LacZ precursors in EphB2LacZ thymus), the recovery did not reach WT levels. These results have confirmed the importance of forward vs. reverse signaling in controlling the lymphoid seeding to the thymus.

Together, these results suggest that, if the frequencies of WT and mutant migrating cells, mainly those expressing CCR7, CCR9, and/or PSGL1, to the thymus do not show significant differences, the processes associated with chemotaxis and migration throughout the thymic blood vessels will become particularly important for explaining the present results. This idea has been further reinforced by the finding that Lin⁻ WT progenitors migrated less efficiently to the mutant thymuses than did those colonizing WT ones. The recruitment of circulating cells is controlled by the combined action of selectins, integrins, and adhesion molecules of the Ig superfamily in concert with chemokine gradients [55]. Numerous data support the relationships among Eph, chemokine/chemokine receptors, and cell migration in different experimental models, including the immune system, although the results are controversial. EphA2 and its ligand ephrinA4 appear to be involved in B cell trafficking [56], and the absence of EphA2 alters the extravasation of immunocompetent cells [22, 27]. EphB-expressing monocytes adhere preferentially to, and transmigrate through, ephrinB2-expressing endothelia [55], and activation of endothelial ephrinB2 reverse signaling has proadhesive and promigrating effects on endothelial cells. In contrast, EphB4 signaling interferes negatively [57]. EphrinB1-Fc proteins stimulate the CXCL12-dependent migration of peripheral blood lymphocytes

[26], and ephrinA1, combined with CXCL12 or CCL19, stimulates migration of memory T cells [58], but ephrinA1, A3, and B2 inhibit CXCL12-induced chemotaxis of thymocytes [27].

In the thymuses of EphB-deficient mice we studied, our present results have demonstrated, as previously reported [37], altered morphologic organization of blood vessels in mutant thymuses, evaluated by laminin expression and electron microscopy examination, and a significant decrease in CCL21 and CCL25 chemokine expression compared with that found in WT thymuses. This finding confirms our previous data on the EphB2^{-/-} and EphB2LacZ thymuses [13]. As indicated, CCR7 and CCR9 receptors have been implicated in thymic homing in fetal and adult mice [4, 8, 30, 59]. Presumably, other chemokine receptors are also involved in progenitor migration into the thymus (e.g., CXCR4 and CCR5), but their contribution requires additional confirmation [60]. Our results have also demonstrated CCL21 expression in the thymic MECA32⁺ blood vessel endothelia that could be key to the interaction with CCR7⁺ circulating progenitor cells and favor their migration, just as other investigators have emphasized [1]. A quantitative study of this CCL21 expression associated with thymic endothelia again showed a significant decrease in mutant thymuses with respect to WT values. In contrast, CCL25 is strongly expressed by TECs throughout the thymic parenchyma and only appears to be slightly associated with some blood vessels. Thus, presumably, a gradient of CCL25 molecules would permeate the blood vessel walls to participate in the attraction of circulating CCR9⁺ migrating cells.

Both CCL21 and CCL25 expression was significantly diminished in thymic MECA32⁺ endothelial cells in both EphB2^{-/-} and EphB3^{-/-} mice but not in EphB2LacZ mice compared with WT thymuses. Likewise, the reduction in P-selectin expression is very important in both EphB2- and EphB3-deficient thymuses but does not show significant differences to WT values in the EphB2LacZ thymuses. In agreement, we had demonstrated previously that the migration mediated by chemokines of EphB2^{-/-} Lin⁻ BM-derived progenitor cells, examined in transwell assays, was significantly reduced [13]. Next, we hypothesized that the lack of chemokine receptor costimulation by EphB2 in EphB2^{-/-} progenitor cells could account for the reduced migration, but that in EphB2LacZ progenitors, the presence of the extracellular domain could evoke certain cross-stimulations, which might explain the greater degree of thymic colonization found in these mice. Crosstalk among Eph/ephrins, integrins, and chemokine receptors has been repeatedly described in other systems, concluding the participation of different intracellular pathways that modulate activation of second messengers, including Ras, Rho, focal adhesion kinase, and others [61].

The relationships between Eph/ephrins and selectins have been less studied but EphB4 activation upregulates PSGL1 in endothelial progenitor cells, resulting in increased homing [62]. In contrast, although the absence of EphB2 or EphB3 from the cell surface of lymphoid progenitors did not seem to affect their PSGL1 expression, decreased expression of its ligand, P-selectin, on the thymic endothelial cells of both EphB2^{-/-} and EphB3^{-/-} mice could contribute to the reduced thymic colonization observed in those mice.

Changes in the expression of ephrinB studied in EphB-deficient thymuses are also relevant for explaining the decreased migration into the thymus of EphB-deficient mice. Again, no significant differences were found in the expression of both ephrinB1 and ephrinB2 on the endothelia of EphB2LacZ thymuses. However, the expression of these ephrinB decreases significantly in the vascular endothelia of EphB2-deficient thymuses, more severely in the case of ephrinB1. EphrinB1 expression is also reduced in the EphB3^{-/-} thymic endothelia compared with that of WT ones. However, no significant differences were seen in the expression of ephrinB2. Together, these results suggest that ephrinB1 could be more relevant than ephrinB2 for lymphoid seeding of the adult thymus. On this respect, in a cancer cell line, EphB2 is strongly phosphorylated by ephrinB1, weakly by ephrinB2, and little or not at all by ephrinB3 [63]. Thus, our results show an interesting correlation among reduced lymphoid colonization of the adult thymus, the absence of either EphB2 or EphB3, and changes in the thymus microenvironment that affects the expression of certain chemokines, P-selectin, and EphB ligands. Moreover, the forward signals mediated by the EphB2-ephrinB1 pair signaling appear to be the most important regulatory factor of the process.

AUTHORSHIP

D.A. conceived, designed, and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the report; J.G.-C. assisted in colonization assays, electron microscopy studies, and data analysis; D.F.-O. contributed to the colonization assays and data analysis; E.T.-G. contributed to the FACS analysis; S.M. assisted in animal mating and genotyping; V.C.-A. contributed to the data analysis and revised the manuscript; W.S. contributed to the data analysis and revised the manuscript; A.Z. contributed to the experiment design, electron microscopy studies, data analysis, reagents, and wrote the report.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Cytometry and Fluorescence Microscopy Center (Complutense University of Madrid) for their technical assistance. This work was supported by Grants RD06/0010/0003 and RD12/0019/0007, from the Spanish Health Ministry; Grant BFU2010-18250, from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness; Grant PHB2008-0002-PC, from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports and from the CAPES-DGU (Spanish-Brazilian joint research program).

DISCLOSURES

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Zhang, S. L., Bhandoola, A. (2014) Trafficking to the thymus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **373**, 87–111.
2. Jenkinson, W. E., Rossi, S. W., Parnell, S. M., Agace, W. W., Takahama, Y., Jenkinson, E. J., Anderson, G. (2007) Chemokine receptor expression

- defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2090–2096.
3. Kawakami, N., Nishizawa, F., Sakane, N., Iwao, M., Tsujikawa, K., Ikawa, M., Okabe, M., Yamamoto, H. (1999) Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus. *J. Immunol.* **163**, 3211–3216.
4. Liu, C., Saito, F., Liu, Z., Lei, Y., Uehara, S., Love, P., Lipp, M., Kondo, S., Manley, N., Takahama, Y. (2006) Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* **108**, 2531–2539.
5. Wada, K., Kina, T., Kawamoto, H., Kondo, M., Katsura, Y. (1996) Requirement of cell interactions through adhesion molecules in the early phase of T cell development. *Cell. Immunol.* **170**, 11–19.
6. Gossens, K., Naus, S., Corbel, S. Y., Lin, S., Rossi, F. M., Kast, J., Ziltener, H. J. (2009) Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J. Exp. Med.* **206**, 761–778.
7. Scimone, M. L., Aifantis, I., Apostolou, I., von Boehmer, H., von Andrian, U. H. (2006) A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7006–7011.
8. Zlotoff, D. A., Sambandam, A., Logan, T. D., Bell, J. J., Schwarz, B. A., Bhandoola, A. (2010) CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* **115**, 1897–1905.
9. Lei, Y., Liu, C., Saito, F., Fukui, Y., Takahama, Y. (2009) Role of DOCK2 and DOCK180 in fetal thymus colonization. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2695–2702.
10. Drake, P. M., Stock, C. M., Nathan, J. K., Gip, P., Golden, K. P., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Bertozzi, C. R. (2009) Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 11995–12000.
11. Golan, K., Vagima, Y., Ludin, A., Itkin, T., Cohen-Gur, S., Kalinkovich, A., Kollet, O., Kim, C., Schajnovitz, A., Ovadya, Y., Lapid, K., Shvitiel, S., Morris, A. J., Ratajczak, M. Z., Lapidot, T. (2012) S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release. *Blood* **119**, 2478–2488.
12. Mendes-da-Cruz, D. A., Stımamiglio, M. A., Muñoz, J. J., Alfaro, D., Terra-Granado, E., García-Ceca, J., Alonso-Colmenar, L. M., Savino, W., Zapata, A. G. (2012) Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. *FASEB J.* **26**, 4390–4399.
13. Stımamiglio, M. A., Jiménez, E., Silva-Barbosa, S. D., Alfaro, D., García-Ceca, J. J., Muñoz, J. J., Cejalvo, T., Savino, W., Zapata, A. (2010) EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 483–494.
14. Pasquale, E. B. (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133**, 38–52.
15. Muñoz, J. J., Cejalvo, T., Alonso-Colmenar, L. M., Alfaro, D., García-Ceca, J., Zapata, A. (2011) Eph/Ephrin-mediated interactions in the thymus. *Neuroimmunomodulation* **18**, 271–280.
16. Alfaro, D., Muñoz, J. J., García-Ceca, J., Cejalvo, T., Jiménez, E., Zapata, A. (2008) Alterations in the thymocyte phenotype of EphB-deficient mice largely affect the double negative cell compartment. *Immunology* **125**, 131–143.
17. García-Ceca, J., Jiménez, E., Alfaro, D., Cejalvo, T., Chumley, M. J., Henkemeyer, M., Muñoz, J. J., Zapata, A. G. (2009) On the role of Eph signalling in thymus histogenesis; EphB2/B3 and the organizing of the thymic epithelial network. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 971–982.
18. Alfaro, D., Muñoz, J. J., García-Ceca, J., Cejalvo, T., Jiménez, E., Zapata, A. G. (2011) The Eph/ephrinB signal balance determines the pattern of T-cell maturation in the thymus. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 844–852.
19. Cejalvo, T., Munoz, J. J., Tobajas, E., Alfaro, D., García-Ceca, J., Zapata, A. (2014) Conditioned deletion of ephrinB1 and/or ephrinB2 in either thymocytes or thymic epithelial cells alters the organization of thymic medulla and favors the appearance of thymic epithelial cysts. *Histochem. Cell Biol.* doi:10.1007/s00418-014-1296-9 [Epub ahead of print].
20. Cejalvo, T., Munoz, J. J., Tobajas, E., Fanlo, L., Alfaro, D., García-Ceca, J., Zapata, A. (2013) Ephrin-B-dependent thymic epithelial cell-thymocyte interactions are necessary for correct T cell differentiation and thymus histology organization: relevance for thymic cortex development. *J. Immunol.* **190**, 2670–2681.
21. García-Ceca, J., Alfaro, D., Montero-Herradón, S., Zapata, A. G. (2013) Eph/ephrinB signalling is involved in the survival of thymic epithelial cells. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 130–138.
22. Aasheim, H. C., Delabie, J., Finne, E. F. (2005) Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood* **105**, 2869–2876.
23. Chan, B., Sukhatme, V. P. (2009) Receptor tyrosine kinase EphA2 mediates thrombin-induced upregulation of ICAM-1 in endothelial cells in vitro. *Thromb. Res.* **123**, 745–752.
24. De Saint-Vis, B., Bouchet, C., Gautier, G., Valladeau, J., Caux, C., Garrone, P. (2003) Human dendritic cells express neuronal Eph receptor tyrosine kinases: role of EphA2 in regulating adhesion to fibronectin. *Blood* **102**, 4431–4440.
25. Ivanov, A. I., Romanovsky, A. A. (2006) Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. *JUBMB Life* **58**, 389–394.
26. Kitamura, T., Kabuyama, Y., Kamataki, A., Homma, M. K., Kobayashi, H., Aota, S., Kikuchi, S., Homma, Y. (2008) Enhancement of lymphocyte migration and cytokine production by ephrinB1 system in rheumatoid arthritis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**, C189–C196.
27. Sharfe, N., Freywald, A., Toro, A., Dadi, H., Roifman, C. (2002) Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3745–3755.
28. Trinidad, E. M., Ballesteros, M., Zuloaga, J., Zapata, A., Alonso-Colmenar, L. M. (2009) An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. *Blood* **114**, 5081–5090.
29. Zamora, D. O., Babra, B., Pan, Y., Planck, S. R., Rosenbaum, J. T. (2006) Human leukocytes express ephrinB2 which activates microvascular endothelial cells. *Cell. Immunol.* **242**, 99–109.
30. Krueger, A., Willenzon, S., Lyszkiewicz, M., Kremmer, E., Förster, R. (2010) CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* **115**, 1906–1912.
31. Schwarz, B. A., Sambandam, A., Maillard, I., Harman, B. C., Love, P. E., Bhandoola, A. (2007) Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J. Immunol.* **178**, 2008–2017.
32. Zlotoff, D. A., Zhang, S. L., De Obaldia, M. E., Hess, P. R., Todd, S. P., Logan, T. D., Bhandoola, A. (2011) Delivery of progenitors to the thymus limits T-lineage reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* **118**, 1962–1970.
33. Rossi, F. M., Corbel, S. Y., Merzaban, J. S., Carlow, D. A., Gossens, K., Duenas, J., So, L., Yi, L., Ziltener, H. J. (2005) Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat. Immunol.* **6**, 626–634.
34. Bhandoola, A., Sambandam, A. (2006) From stem cell to T cell: one route or many? *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 117–126.
35. Prockop, S. E., Petrie, H. T. (2004) Functional assessment of alphaEbeta7/E-cadherin interactions in the steady state postnatal thymus. *Clin. Dev. Immunol.* **11**, 135–141.
36. Vicente, R., Adjali, O., Jacquet, C., Zimmermann, V. S., Taylor, N. (2010) Intrathymic transplantation of bone marrow-derived progenitors provides long-term thymopoiesis. *Blood* **115**, 1913–1920.
37. Adams, R. H., Wilkinson, G. A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N. W., Deutsch, U., Risau, W., Klein, R. (1999) Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* **13**, 295–306.
38. Nikolov, D. B., Xu, K., Himanen, J. P. (2013) Eph/ephrin recognition and the role of Eph/ephrin clusters in signaling initiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 2160–2165.
39. Azab, F., Azab, A. K., Maiso, P., Calimeri, T., Flores, L., Liu, Y., Quang, P., Roccaro, A. M., Sacco, A., Ngo, H. T., Zhang, Y., Morgan, B. L., Carrasco, R. D., Ghobrial, I. M. (2012) Eph-B2/ephrin-B2 interaction plays a major role in the adhesion and proliferation of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin. Cancer Res.* **18**, 91–104.
40. Conover, J. C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D., Alvarez-Buylla, A. (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat. Neurosci.* **3**, 1091–1097.
41. Villar-Cervino, V., Molano-Mazón, M., Catchpole, T., Valdeolmillos, M., Henkemeyer, M., Martínez, L. M., Borrell, V., Marín, O. (2013) Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron* **77**, 457–471.
42. Khounlotham, M., Subbian, S., Smith III, R., Cirillo, S. L., Cirillo, J. D. (2009) Mycobacterium tuberculosis interferes with the response to infection by inducing the host EphA2 receptor. *J. Infect. Dis.* **199**, 1797–1806.
43. Steinecke, A., Gampe, C., Zimmer, G., Rudolph, J., Bolz, J. (2014) EphA/ephrin A reverse signaling promotes the migration of cortical interneurons from the medial ganglionic eminence. *Development* **141**, 460–471.
44. Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J. P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., Bhandoola, A. (2003) Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat. Immunol.* **4**, 168–174.
45. Luc, S., Luis, T. C., Boukarabila, H., Macaulay, I. C., Buza-Vidas, N., Bouriez-Jones, T., Lutteropp, M., Woll, P. S., Loughran, S. J., Mead, A. J., Hultquist, A., Brown, J., Mizukami, T., Matsuoka, S., Ferry, H., Anderson, K., Duarte, S., Atkinson, D., Soneji, S., Domanski, A., Farley, A., Sanjuan-Pla, A., Carella, C., Patient, R., de Bruijn, M., Enver, T., Nerlov, C., Blackburn, C., Godin, I., Jacobsen, S. E. (2012) The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nat. Immunol.* **13**, 412–419.
46. Zapata, A. G. 2014. The adult hematopoietic niches—cellular composition, histological organization and physiological regulation. In *Adult Stem Cell Niches*. (S. Wislet-Gendebien, ed.), InTech, Rijeka, 21–48.
47. Arthur, A., Zannettino, A., Panagopoulos, R., Koblar, S. A., Sims, N. A., Stylianou, C., Matsuo, K., Gronthos, S. (2011) EphB/ephrin-B

- interactions mediate human MSC attachment, migration and osteochondral differentiation. *Bone* **48**, 533–542.
48. Inada, T., Iwama, A., Sakano, S., Ohno, M., Sawada, K., Suda, T. (1997) Selective expression of the receptor tyrosine kinase, HTK, on human erythroid progenitor cells. *Blood* **89**, 2757–2765.
 49. Suenobu, S., Takakura, N., Inada, T., Yamada, Y., Yuasa, H., Zhang, X. Q., Sakano, S., Oike, Y., Suda, T. (2002) A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1124–1131.
 50. Ting, M. J., Day, B. W., Spanevello, M. D., Boyd, A. W. (2010) Activation of ephrin A proteins influences hematopoietic stem cell adhesion and trafficking patterns. *Exp. Hematol.* **38**, 1087–1098.
 51. Ivanova, N. B., Dimos, J. T., Schaniel, C., Hackney, J. A., Moore, K. A., Lemischka, I. R. (2002) A stem cell molecular signature. *Science* **298**, 601–604.
 52. Salvucci, O., de la Luz Sierra, M., Martina, J. A., McCormick, P. J., Tosato, G. (2006) EphB2 and EphB4 receptors forward signaling promotes SDF-1-induced endothelial cell chemotaxis and branching remodeling. *Blood* **108**, 2914–2922.
 53. Lu, Q., Sun, E. E., Klein, R. S., Flanagan, J. G. (2001) Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* **105**, 69–79.
 54. Arvanitis, D., Davy, A. (2008) Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev.* **22**, 416–429.
 55. Pfaff, D., Héroult, M., Riedel, M., Reiss, Y., Kirmse, R., Ludwig, T., Korff, T., Hecker, M., Augustin, H. G. (2008) Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. *J. Cell Sci.* **121**, 3842–3850.
 56. Trinidad, E. M., Zapata, A. G., Alonso-Colmenar, L. M. (2010) Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration. *Cell Adhes. Migr.* **4**, 363–367.
 57. Füller, T., Korff, T., Kilian, A., Dandekar, G., Augustin, H. G. (2003) Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells. *J. Cell Sci.* **116**, 2461–2470.
 58. Holen, H. L., Shadidi, M., Narvhus, K., Kjosnes, O., Tierens, A., Aasheim, H. C. (2008) Signaling through ephrin-A ligand leads to activation of Src-family kinases, Akt phosphorylation, and inhibition of antigen receptor-induced apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1183–1191.
 59. Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J. M., Love, P. E. (2002) A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J. Immunol.* **168**, 2811–2819.
 60. Robertson, P., Means, T. K., Luster, A. D., Scadden, D. T. (2006) CXCR4 and CCR5 mediate homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus. *Exp. Hematol.* **34**, 308–319.
 61. Murai, K. K., Pasquale, E. B. (2003) “Eph”ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J. Cell Sci.* **116**, 2823–2832.
 62. Foubert, P., Silvestre, J. S., Souttou, B., Barateau, V., Martin, C., Ebrahimi, T. G., Leré-Déan, C., Contreras, J. O., Sulpice, E., Levy, B. I., Plouët, J., Tobelem, G., Le Ricousse-Roussanne, S. (2007) PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J. Clin. Invest.* **117**, 1527–1537.
 63. Astin, J. W., Batson, J., Kadir, S., Charlet, J., Persad, R. A., Gillatt, D., Oxley, J. D., Nobes, C. D. (2010) Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1194–1204.

KEY WORDS:

EphrinB · chemokines · P-selectin

Eph/ephrins-mediated thymocyte–thymic epithelial cell interactions control numerous processes of thymus biology

Javier García-Ceca¹, David Alfaro¹, Sara Montero-Herradón¹, Esther Tobajas¹, Juan José Muñoz^{2†} and Agustín G. Zapata^{1,2*†}

¹ Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain, ² Cytometry and Fluorescence Microscopy Center, Complutense University, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Daniella Areas Mendes-da-Cruz,
Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz,
Brazil

Reviewed by:

Yousuke Takahama,
University of Tokushima, Japan
Andrew Freywald,
University of Saskatchewan, Canada

*Correspondence:

Agustín G. Zapata,
Department of Cell Biology, Faculty of
Biology, Complutense University,
José Antonio Novais 12, Madrid
28040, Spain
zapata@bio.ucm.es

[†] Juan José Muñoz and Agustín G.
Zapata have contributed equally to
this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance, a section of
the journal *Frontiers in Immunology*

Received: 29 April 2015

Accepted: 15 June 2015

Published: 26 June 2015

Citation:

García-Ceca J, Alfaro D,
Montero-Herradón S, Tobajas E,
Muñoz JJ and Zapata AG (2015)
Eph/ephrins-mediated
thymocyte–thymic epithelial cell
interactions control numerous
processes of thymus biology.
Front. Immunol. 6:333.
doi: 10.3389/fimmu.2015.00333

Numerous studies emphasize the relevance of thymocyte–thymic epithelial cell (TECs) interactions for the functional maturation of intrathymic T lymphocytes. The tyrosine kinase receptors, Ephs (erythropoietin-producing hepatocyte kinases) and their ligands, ephrins (Eph receptor interaction proteins), are molecules known to be involved in the regulation of numerous biological systems in which cell-to-cell interactions are particularly relevant. In the last years, we and other authors have demonstrated the importance of these molecules in the thymic functions and the T-cell development. In the present report, we review data on the effects of Ephs and ephrins in the functional maturation of both thymic epithelial microenvironment and thymocyte maturation as well as on their role in the lymphoid progenitor recruitment into the thymus.

Keywords: thymocytes, thymic epithelium, Eph, ephrin, thymic cell seeding

Introduction

The thymus is a lymphoid organ engaged in the production and homeostatic maintenance of functionally mature T cells, in which developing thymocytes interact sequentially with an epithelial network whose three-dimensional architecture is essential for the process. Thymocyte–thymic epithelial cell (TEC) interactions are, therefore, key for thymus functioning (1), and Eph and ephrins, two groups of molecules involved in these cell-to-cell contacts, have emerged as novel elements governing numerous thymic processes (2). Eph represent the largest group of receptor tyrosine kinases; they bind to surface ligands, ephrins and, according to their sequence homology and affinity for ephrins, are divided into EphA (10 members), which preferentially binds ephrins-A (6 members), ligands bound to the membrane through glycosylphosphatidylinositol, and EphB (6 members) that bind ephrins-B (3 members) that contains a transmembrane domain and a short cytoplasmic tail (3).

Eph/ephrins constitute an ubiquitous system due to the high number of members and their promiscuity, such that a single receptor can bind different ligands and vice versa, albeit with distinct affinities (4). Eph/ephrin-mediated interactions result in bidirectional signaling in the expressing cells, *forward* signals transmitted by Eph, and *reverse* in the ephrin-expressing cell (5), providing different cell responses depending on the multiple combinations and the direction of signaling (4). Eph/ephrins activate numerous signaling pathways that regulate cytoskeleton and cell adhesion but also gene transcription (6).

Eph and/or Ephrin are Expressed in the Thymus and Their Absence Results in Profound Thymic Hypocellularity

Eph and ephrins, particularly those of the B group, are expressed widely in both thymocytes and TECs, frequently the same cell co-expressing the two types of molecules. They appear early in the thymic primordium (7–9) and a lack of these results in decreased numbers of both thymocytes (9–11) and TECs (12). The thymic hypocellularity of Eph/ephrin-deficient mice correlates with concomitant increased apoptosis affecting distinct thymocyte subsets (9–11). However, in all these Eph/ephrin-defective mice, it is difficult to establish conclusive correlations between thymic cellularity and thymocyte proliferation. Even in thymocyte-conditioned ephrin-B1/B2 thymuses, despite the evident reduced cellularity, there are increased proportions of proliferating DP thymocytes (11), suggesting some attempt to recover the thymic cell content (13).

Thymic epithelial cells (TECs) have been proposed to have a limited expanding capacity and the number of endodermal progenitors that organize the early thymic primordium could determine the final size of embryonic and adult thymus (14). Indeed, there is little information on the control of TEC survival and proliferation in general, and by the EphB group in particular. Developing thymuses of EphB2- and/or EphB3-deficient mice show increased TEC apoptosis largely affecting immature EpCAM⁺MTS20⁺ cells and EpCAM⁺Ly51⁺ cTECs, and *in vitro* activation of either EphB or ephrin-B signaling decreases the proportions of apoptotic WT TECs, whereas its disruption in RTOCs resulted in increased TEC death. Importantly, RTOCs established only with EphB-defective TECs yielded higher proportions of apoptotic cells than those observed when RTOCs were established with TECs and total thymocytes, suggesting that TEC survival is governed to a greater extent by Eph–ephrin-mediated thymocyte–TEC interactions (12).

On the other hand, decreased seeding of lymphoid progenitors, which periodically colonize the thymus, could also contribute to organ size and cellularity. Reduced lymphoid seeding into the thymus can be achieved by a reduction in the colonizing progenitor numbers and/or altered mechanisms of migration. Although, EphB2-deficient mice show decreased proportions of early BM hematopoietic progenitors compared to WT mice (15) their contribution to thymic seeding is a matter of discussion (16). On the contrary, BM cells expressing molecules known to be involved in thymus seeding (i.e., CCR7, CCR9, CXCR4, PSGL1) (17, 18) neither exhibit significant changes in EphB-deficient mice (15) nor in the numbers of fetal liver CD45⁺PIRA/B⁺ precursors (unpublished data). Therefore, the lack of EphB affects the migratory capacity of progenitor cells rather than the proportions of colonizing cells.

In vivo and *in vitro* assays have demonstrated that the lack of EphB in either lymphoid progenitors or thymic stroma reduces thymic seeding in both fetal (19, 20) and adult mice (15). *In vitro* colonization of WT FTOCs by EphB2^{-/-} or EphB3^{-/-}, but not EphB2-LacZ, Lin⁻ BM cells was significantly reduced compared to that shown by WT cells (19) and adult WT mice showed lower seeding into the thymus after *in vivo* injection of EphB-deficient

Lin⁻ BM cells than WT ones (15). This inability of progenitors to enter both fetal and adult thymus seems to be dependent, at least partially, on a direct role of Ephs in regulating cell migration, as previously reported for the cell migration of peripheral lymphocytes (21–23). *In vitro* migration of mutant progenitor BM cells was significantly reduced through fibronectin, laminin, or chemokine gradients, with a more severe reduction in EphB2-deficient cells than in EphB2-LacZ counterparts. Moreover, EphB2 stimulation by coated ephrin-B1Fc proteins inhibited laminin- and fibronectin-governing migration as well as CXCL12, CCL21, and CCL25-induced chemotaxis, but EphB2-LacZ cells did not exhibit reduced migration (19). This indicates that the extracellular domain of EphB promotes migration ligand independently while forward signaling promotes cell arrest.

In both experimental approaches, all tested BM progenitors, included WT ones, showed decreased migration into the EphB-deficient thymus, particularly the EphB2^{-/-} one, which indicates the relevance of the thymic microenvironment in the process (15, 19). In fact, in both adult and fetal thymuses, decreased migration correlated with reduced production of ECM components, such as fibronectin and laminin, and chemokines (i.e., CXCL12, CCL21, CCL25) (15, 19). Furthermore, P-selectin involved in progenitor cell migration into the adult thymus (17), showed reduced expression on endothelial cells of both EphB2- and EphB3-deficient thymuses, but not of those of EphB2-LacZ cells, and decreased migration in EphB2^{-/-} thymuses also correlated with reduced endothelial expression of ephrin-B1 and ephrin-B2, whereas in EphB3^{-/-} thymuses, the reduction only affected ephrin-B1, reinforcing the idea that forward signals mediated by the pair EphB2/ephrin-B1 are particularly important for intrathymic lymphoid recruitment (15).

All these results, therefore, support a role for reduced thymic seeding in the thymic hypocellularity found in Eph/ephrin mutants. However, increased apoptosis of both thymocytes and TECs seems to be more relevant because, whereas thymuses deficient in both CCR7 and CCR9 with profoundly altered lymphoid colonization later recover normal thymocyte numbers (24), EphB2- and EphB3-deficient thymuses do not show that compensatory property; on the contrary, they increase their hypocellularity by increasing the death of DN and DP cells (9).

Thymic Alterations Observed in Eph/ephrin-deficient Mice Reflect the Relevance of Thymocyte–TEC Interactions

Eph/ephrin deletion results in specific phenotypic alterations in both thymocytes and TECs. The lack of EphA4 results in a blockade of T cell maturation that results in a drop in DP cell proportions (10) and blockade of Eph/ephrin-A interactions in FTOCs treated with fusion proteins affects the maturation of immature CD4⁻CD8⁺ thymocytes (2). In correlation, these thymuses show a profound collapse of the cortical epithelial network that significantly reduces the number of cell layers and their organization whereas immature K5⁺K8⁺ TECs and areas devoid of epithelial cell marker expression increase. Apparently, the epithelial defects determine the lymphoid phenotype because mutant FTOCs grafted under the WT kidney capsule produce decreased

proportions of DP thymocytes (10) while mutant thymocytes in a WT stroma do not reproduce these changes. On the contrary, in Eph/ephrin-B-deficient mice, alterations are very important in the epithelial component but less severe in the developing thymocytes (9, 11, 25). EphB2- and EphB3-deficient thymuses exhibit minimal changes in the T-cell subset proportions, with an increased percentage of total DN cells and reduction of DN3 (CD44⁺ CD25⁺) cells (9). However, in this case, EphB acts cell-autonomously on T-cell differentiation as grafted EphB-deficient lymphoid fetal thymus lobes colonized by WT lymphoid progenitors exhibit normal T-cell differentiation (26), while chimeric thymuses generated with EphB2^{-/-} and EphB2/B3^{-/-} Lin⁻ BM cell progenitors injected into SCID mice showed a blockade of T-cell maturation at DN stage and chimeras established with EphB3^{-/-} progenitor cells showed a partial blockade at this same point that resulted in low numbers of DP cells (27). Therefore, both EphB2 and EphB3 autonomously control thymocyte development at DN to DP transition. Both molecules are also necessary for the maturation of DP cells to SP thymocytes as demonstrated in reaggregates (RTOCs) formed with EphB2- or EphB3-deficient DP thymocytes and WT TECs (28). Eph expression on thymocytes is also important for thymocyte survival as in all these chimeric SCID mice there were increased proportions of apoptotic thymocytes, principally DP and SP CD4⁺ cells. Both thymocyte differentiation and survival seem to be dependent on Eph/ephrin-mediated thymocyte-TECs interaction and regulated by both forward and reverse signals, as SCID mice receiving EphB2-LacZ cells showed DP cells but did not produce SP thymocytes and did not show increased apoptosis. Therefore, although Eph forward signaling on thymocytes is necessary for thymocyte development, reverse signaling on interacting cells, presumably thymic epithelium, partially rescues DN cell progression to the DP cell compartment, and is important for cell survival (27). Accordingly, conditional deletion of ephrin-B1 and/or ephrin-B2 in TECs also affects the T-cell development and the lack of ephrin-B2 is presumably the most important, although ephrin-B1 also contributes, as double mutants show a more severe affection (11). In addition, specific deletion of these ephrins in thymocytes results in a partial blockade of T-cell maturation at the DN3 stage (11, 29, 30) and increased thymocyte apoptosis (11). The phenotype is similar in single and double mutants suggesting that both molecules have a cooperative rather than redundant role in thymocyte maturation (11). A similar phenotype, however, has not been found when EphB2- or EphB3-deficient thymocytes are developed in a WT stroma in a bone marrow transplantation experiment into SCID mice (26).

Eph and ephrin signaling also affect thymic epithelium development and organization as in both EphB- and ephrin-B-mutant mice there is a profound transformation of thymic epithelium that exhibits altered TEC phenotypes (i.e., immature K5⁺K8⁺MTS10⁺ medullary epithelial cells (mTECs), cortical K5⁺K8⁺MTS20⁺ cells and K5⁺K8⁺ cells) and altered 3D organization. This change provokes a 2D structure that results in increased epithelial cysts, collapsed epithelium, and large areas devoid of epithelial cell markers (11, 25, 31). These latter areas, of unknown significance, also exist in WT thymuses and in other mice with defects in molecules, such as Foxn1, Kremen 1, or Stat3, involved in TEC maturation (32–34), but are specially developed

in EphB-deficient thymuses. They contain thymocytes and blood vessels, frequently surrounded by enlarged sheaths of connective tissue, and are different in cortex and medulla: the former ones contain thymocytes and some sheathed blood vessels, whereas in the medulla mTECs delimit areas with enlarged blood vessels, increased numbers of ER-TR7⁺ fibroblasts, components of the ECM (collagen IV, fibronectin, and laminin) (35), dendritic cells (36), and thymocytes in some areas (37–39).

Cortical areas devoid of epithelium have been described by others (37–39), receiving the name of epithelial-free areas (EFAs). EFAs are MHC class-II negative, little vascularized areas that contain abundant thymocytes frequently in division (39) reported as accumulations of DP thymocytes that do not undergo positive selection and will die subsequently by apoptosis (40). On the contrary, medullary epithelium-free areas that express several connective tissue markers could have a mesenchymal condition (35) and represent areas in which Eph-deficient TECs have undergone an epithelial-mesenchymal transition, losing their epithelial cell markers and acquiring a mesenchymal nature. In Eph mutant mice, EFAs could arise as a consequence of impeded intermingling and mutual exclusion of thymocytes and TECs caused by the lack of Eph-ephrin signaling as known in other systems (41).

Presumably, TEC maturation is autonomously governed by EphB2 and EphB3 expressed on TECs, as some of the phenotypic alterations found in EphB2- or EphB3-deficient mice can be reproduced in grafted mutant lobes colonized by WT host thymocytes. However, EphB expressed on thymocytes can also play a non-autonomous role since the epithelial phenotype of these grafted mutant lobes was not exactly the same as that found in EphB-deficient thymuses (26), and chimeric SCID thymuses receiving EphB-deficient thymocytes showed altered histological organization (27).

Selective deletion of ephrin-B1 and/or ephrin-B2 genes in thymocytes or TECs permits to determine the relevance of Eph/ephrin signaling in distinct thymic components (11). In all ephrin-B-deficient mice, but particularly in the double mutants with ephrin-B1 and ephrin-B2 deleted in TECs, the thymuses are small, with scarcely developed cortex and medulla, high numbers of K5⁺K8⁺ cells, and numerous epithelial cysts. Ephrin-B2 deletion in TECs causes altered distribution of Ly51⁺ cortical (c) TEC subsets defined as Ly51^{hi} cells that express DLL4, and would constitute the cortical niche of DN thymocytes and Ly51^{lo} cTECs that would represent that of DP cells. Thus, ephrin-B1 deletion in TECs but, also, the lack of ephrin-B1 and B2 in thymocytes induce a cortex in which rounded groups of cTECs express Ly51 homogeneously, suggesting that ephrin-B1 and B2 expressed in both thymocytes and TECs cooperate in regulating the differentiation and distribution of cortical niches (11). Furthermore, ephrin-B deletion from both thymocytes and TECs affects medulla organization. The medulla of thymuses bearing a deletion of ephrin-B1 or B2 in thymocytes, or those without ephrin-B1 or ephrin-B1/B2 in TECs, shows increased numbers of large mono-layered epithelial cysts formed largely by immature K5⁺K8⁺, sometimes MTS20⁺, TECs, but rarely containing mature UEA1⁺ or MTS10⁺ cells that would represent an arrest of medulla development at an immature stage. They also contain numerous UEA1^{hi} cells that form small cysts surrounded by a thin rim of

UEA1^{lo/-}MTS10⁺ cells that would represent a certain blockade of medulla organization at a late stage of development, in which medullary TEC subsets UEA1^{hi}MTS10⁻ and UEA1^{lo}MTS10⁺ develop but MTS20⁺ cell expansion and 3D organization are affected (31).

Interestingly, these studies support that ephrin-B1 and ephrin-B2 deletion in TECs result in different TEC phenotypes similar to those generated by ephrin-B1 or ephrin-B2 deletion in thymocytes. This, once again, indicates that Eph/ephrin-mediated thymocyte-TEC interactions are also important for TEC development and arrangement. Although, these molecules also mediate homotypic interactions (thymocyte-thymocyte; TEC-TEC), presumably their involvement in thymocyte-TEC interactions is more important to explain their role in the thymus. However, there are no complementary phenotypes when the effects of ephrin deletion in TECs are compared with those observed in thymuses with EphB-deficient epithelium, or when Eph mutant or ephrin mutant phenotypes are compared. This indicates that in the thymus, as in other systems (4), the final balance of *forward* and *reverse* signals in thymocytes and/or TECs would be more relevant than the mere presence/absence of certain Eph or ephrins. Besides, other factors must contribute to the complexity of the system as phenotypes in different mutant models are more severe in mice with C57/Bl6-CD1 mixed background than in the non-inbred strain C57/Bl6 (10, 11).

In vitro experiments also clearly support the relevance of Eph/ephrin-mediated thymocyte-TEC interactions in thymus biology: ephrin-B1Fc proteins added to RTOCs, formed by fetal TECs and DP thymocytes, disorganize the 3D thymic epithelial network, prevent thymocyte-TEC association, and alter TCR $\alpha\beta$ signaling (28). Numbers and timing of the establishment of cell conjugates also change when they are established with EphB-deficient DP thymocytes (27).

On the other hand, proper T-cell maturation occurs thanks to the movement of developing thymocytes throughout the thymic parenchyma, facilitating their interactions with distinct niches favoring the necessary thymocyte-TEC crosstalk (42). Analysis by confocal microscopy of the positioning of

EphB2-deficient or WT Lin⁻ BM progenitors in reconstituted FTOCs demonstrated that higher numbers of WT cells reached the central area of WT lobes than of EphB2-deficient cells (19). Furthermore, EphB2^{-/-} total thymocytes migrate less efficiently through laminin or fibronectin or in response to CXCL12, CCL21, or CCL25, than WT cells. More importantly, when *forward* EphB2 signals were activated by ephrin-B1Fc protein treatment, there was a significant reduction in the migration of all EphB2^{-/-}, but not EphB2-LacZ, thymocyte subsets. Therefore, together with chemokines and ECM molecules, the migration of developing thymocytes throughout the thymic stroma could be promoted by inactivated EphB2 receptors, and negatively modulated by EphB2/ephrin-B interactions (19).

Remarkably, these profound phenotypic alterations observed in mice deficient in distinct Eph or ephrins do not correlate with immune deficiencies and/or pathological processes. EphA4^{-/-} thymuses (10) and those with deleted ephrin-B1 and/or ephrin-B2 in TECs (11) show decreased proportions of both DP TCR $\alpha\beta$ ^{hi} cells and CD69⁺ cells that could reflect an inefficient TCR $\alpha\beta$ selection. However, peripheral lymphoid organs of both EphA4^{-/-} mice (10) and EphB-deficient mice (9) show decreased numbers of total T cells, but not significant changes in the proportions of distinct T-cell subsets. In addition, there are no changes in the central and peripheral TCR $\alpha\beta$ repertoire expressed on CD4⁺ T cells of EphB2- and/or EphB3-mutant mice, except for an increased proportion of V β 3⁺CD4⁺ cells in both thymus and lymph nodes of the three mutants (43).

In summary, Eph and ephrins are molecules that through mediating thymocyte-TEC interactions are involved in numerous processes occurring into the thymus, including cell migration into and through thymus, T-cell differentiation, and TEC maturation.

Acknowledgments

This work was supported by grants RD06/0010/0003 and RD12/0019/0007, from the Spanish Health Ministry; BFU2010-18250 and BFU2013-41112-R, from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

References

- Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DI, Izon DJ, Wilson TJ, Davidson NJ, et al. The thymic microenvironment. *Immunol Today* (1993) **14**(9):445–59. doi:10.1016/0167-5699(93)90248-J
- Munoz JJ, Cejalvo T, Alonso-Colmenar LM, Alfaro D, García-Ceca J, Zapata A. Eph/ephrin-mediated interactions in the thymus. *Neuroimmunomodulation* (2011) **18**(5):271–80. doi:10.1159/000329490
- Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, et al. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* (1996) **17**(1):9–19. doi:10.1016/S0896-6273(00)80276-7
- Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* (2008) **133**(1):38–52. doi:10.1016/j.cell.2008.03.011
- Knoll B, Drescher U. Ephrin-as as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* (2002) **25**(3):145–9. doi:10.1016/S0166-2236(00)02093-2
- Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* (2004) **7**(4):465–80. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.006
- Munoz JJ, Alonso CL, Sacedon R, Crompton T, Vicente A, Jimenez E, et al. Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. *J Immunol* (2002) **169**(1):177–84. doi:10.4049/jimmunol.169.1.177
- Vergara-Silva A, Schaefer KL, Berg LJ. Compartmentalized Eph receptor and ephrin expression in the thymus. *Mech Dev* (2002) **119**(Suppl 1):S225–9. doi:10.1016/S0925-4773(03)00121-7
- Alfaro D, Munoz JJ, García-Ceca J, Cejalvo T, Jimenez E, Zapata A. Alterations in the thymocyte phenotype of EphB-deficient mice largely affect the double negative cell compartment. *Immunology* (2008) **125**(1):131–43. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02828.x
- Munoz JJ, Alfaro D, García-Ceca J, Alonso CL, Jimenez E, Zapata A. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J Immunol* (2006) **177**(2):804–13. doi:10.4049/jimmunol.177.2.804
- Cejalvo T, Munoz JJ, Tobajas E, Fanlo L, Alfaro D, García-Ceca J, et al. Ephrin-B-dependent thymic epithelial cell-thymocyte interactions are necessary for correct T cell differentiation and thymus histology organization: relevance for thymic cortex development. *J Immunol* (2013) **190**(6):2670–81. doi:10.4049/jimmunol.1201931

12. García-Ceca J, Alfaro D, Montero-Herradón S, Zapata AG. Eph/ephrinB signalling is involved in the survival of thymic epithelial cells. *Immunol Cell Biol* (2013) **91**(2):130–8. doi:10.1038/icb.2012.59
13. Yu G, Mao J, Wu Y, Luo H, Wu J. Ephrin-B1 is critical in T-cell development. *J Biol Chem* (2006) **281**(15):10222–9. doi:10.1074/jbc.M510320200
14. Jenkinson WE, Bacon A, White AJ, Anderson G, Jenkinson EJ. An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. *J Immunol* (2008) **181**(9):6101–8. doi:10.4049/jimmunol.181.9.6101
15. Alfaro D, García-Ceca J, Farias-de-Oliveira DA, Terra-Granado E, Montero-Herradón S, Cotta-de-Almeida V, et al. EphB2 and EphB3 play an important role in the lymphoid seeding of murine adult thymus. *J Leukoc Biol* (2015). doi:10.1189/jlb.1H1114-568R
16. Zhang SL, Bhandoola A. Trafficking to the thymus. *Curr Top Microbiol Immunol* (2014) **373**:87–111. doi:10.1007/82_2013_324
17. Gossens K, Naus S, Corbel SY, Lin S, Rossi FM, Kast J, et al. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J Exp Med* (2009) **206**(4):761–78. doi:10.1084/jem.20082502
18. Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz BA, Bhandoola A. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* (2010) **115**(10):1897–905. doi:10.1182/blood-2009-08-237784
19. Stimamiglio MA, Jimenez E, Silva-Barbosa SD, Alfaro D, García-Ceca JJ, Munoz JJ, et al. EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. *J Leukoc Biol* (2010) **88**(3):483–94. doi:10.1189/jlb.0210079
20. Mendes-da-Cruz DA, Stimamiglio MA, Munoz JJ, Alfaro D, Terra-Granado E, García-Ceca J, et al. Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. *FASEB J* (2012) **26**(11):4390–9. doi:10.1096/fj.11-202952
21. Sharfe N, Freywald A, Toro A, Dadi H, Roifman C. Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur J Immunol* (2002) **32**(12):3745–55. doi:10.1002/1521-4141(200212)32:12<3745:AID-IMMU3745>3.0.CO;2-M
22. Aasheim HC, Delabie J, Finne EF. Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood* (2005) **105**(7):2869–76. doi:10.1182/blood-2004-08-2981
23. Trinidad EM, Ballesteros M, Zuloaga J, Zapata A, Alonso-Colmenar LM. An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. *Blood* (2009) **114**(24):5081–90. doi:10.1182/blood-2009-03-210617
24. Liu C, Saito F, Liu Z, Lei Y, Uehara S, Love P, et al. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* (2006) **108**(8):2531–9. doi:10.1182/blood-2006-05-024190
25. García-Ceca J, Jimenez E, Alfaro D, Cejalvo T, Chumley MJ, Henkemeyer M, et al. On the role of Eph signalling in thymus histogenesis; EphB2/B3 and the organizing of the thymic epithelial network. *Int J Dev Biol* (2009) **53**(7):971–82. doi:10.1387/ijdb.082702jg
26. García-Ceca J, Jimenez E, Alfaro D, Cejalvo T, Munoz JJ, Zapata AG. Cell-autonomous role of EphB2 and EphB3 receptors in the thymic epithelial cell organization. *Eur J Immunol* (2009) **39**(10):2916–24. doi:10.1002/eji.200939437
27. Alfaro D, Munoz JJ, García-Ceca J, Cejalvo T, Jimenez E, Zapata AG. The Eph/ephrinB signal balance determines the pattern of T-cell maturation in the thymus. *Immunol Cell Biol* (2011) **89**(8):844–52. doi:10.1038/icb.2010.172
28. Alfaro D, García-Ceca JJ, Cejalvo T, Jimenez E, Jenkinson EJ, Anderson G, et al. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur J Immunol* (2007) **37**(9):2596–605. doi:10.1002/eji.200737097
29. Jin W, Qi S, Luo H. The effect of conditional EFN1 deletion in the T cell compartment on T cell development and function. *BMC Immunol* (2011) **12**:68. doi:10.1186/1471-2172-12-68
30. Luo H, Charpentier T, Wang X, Qi S, Han B, Wu T, et al. Efnb1 and Efnb2 proteins regulate thymocyte development, peripheral T cell differentiation, and antiviral immune responses and are essential for interleukin-6 (IL-6) signaling. *J Biol Chem* (2011) **286**(48):41135–52. doi:10.1074/jbc.M111.302596
31. Cejalvo T, Munoz JJ, Tobajas E, Alfaro D, García-Ceca J, Zapata A. Conditioned deletion of ephrinB1 and/or ephrinB2 in either thymocytes or thymic epithelial cells alters the organization of thymic medulla and favors the appearance of thymic epithelial cysts. *Histochem Cell Biol* (2015) **143**(5):517–29. doi:10.1007/s00418-014-1296-9
32. Sano S, Takahama Y, Sugawara T, Kosaka H, Itami S, Yoshikawa K, et al. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity* (2001) **15**(2):261–73. doi:10.1016/S1074-7613(01)00180-7
33. Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol* (2003) **4**(11):1128–35. doi:10.1038/ni983
34. Osada M, Ito E, Fermin HA, Vazquez-Cintrón E, Venkatesh T, Friedel RH, et al. The Wnt signaling antagonist Kremen1 is required for development of thymic architecture. *Clin Dev Immunol* (2006) **13**(2–4):299–319. doi:10.1080/17402520600935097
35. Clarke AG, Gil AL, Kendall MD. The effects of pregnancy on the mouse thymic epithelium. *Cell Tissue Res* (1994) **275**(2):309–18. doi:10.1007/BF00319429
36. Sawanobori Y, Ueta H, Dijkstra CD, Park CG, Satou M, Kitazawa Y, et al. Three distinct subsets of thymic epithelial cells in rats and mice defined by novel antibodies. *PLoS One* (2014) **9**(10):e109995. doi:10.1371/journal.pone.0109995
37. von Gaudecker B. The development of the human thymus microenvironment. *Curr Top Pathol* (1986) **75**:1–41.
38. Godfrey DI, Izon DJ, Tucek CL, Wilson TJ, Boyd RL. The phenotypic heterogeneity of mouse thymic stromal cells. *Immunology* (1990) **70**(1):66–74.
39. Bruijntjes JP, Kuper CF, Robinson JE, Schuurman HJ. Epithelium-free area in the thymic cortex of rats. *Dev Immunol* (1993) **3**(2):113–22. doi:10.1155/1993/90759
40. Boyd RL, Hugo P. Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol Today* (1991) **12**(2):71–9. doi:10.1016/0167-5699(91)90161-L
41. Wilkinson DG. Regulation of cell differentiation by Eph receptor and ephrin signaling. *Cell Adh Migr* (2014) **8**(4):339–48. doi:10.4161/19336918.2014.970007
42. Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol* (2012) **33**(6):256–63. doi:10.1016/j.it.2012.03.005
43. Munoz JJ, Alfaro D, García-Ceca J, Cejalvo T, Stimamiglio MA, Jimenez E, et al. Eph and ephrin: key molecules for the organization and function of the thymus gland. *Immunología* (2009) **28**(1):19–31. doi:10.1111/j.1749-6632.2008.03965.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 García-Ceca, Alfaro, Montero-Herradón, Tobajas, Muñoz and Zapata. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ORIGINAL ARTICLE

Eph/ephrinB signalling is involved in the survival of thymic epithelial cells

Javier García-Ceca, David Alfaro, Sara Montero-Herradón and Agustín G Zapata

The signals that determine the survival/death of the thymic epithelial cells (TECs) component during embryonic development of the thymus are largely unknown. In this study, we combine different *in vivo* and *in vitro* experimental approaches to define the role played by the tyrosine kinase receptors EphB2 and EphB3 and their ligands, ephrinsB, in the survival of embryonic and newborn (NB) TECs. Our results conclude that EphB2 and EphB3 are involved in the control of TEC survival and that the absence of these molecules causes increased apoptotic TEC proportions that result in decreased numbers of thymic cells and a smaller-sized gland. Furthermore, *in vitro* studies using either EphB2-Fc or ephrinB1-Fc fusion proteins demonstrate that the blockade of Eph/ephrinB signalling increases TEC apoptosis, whereas its activation rescues TECs from cell death. In these assays, both heterotypic thymocyte–TEC and homotypic TEC–TEC interactions are important for Eph/ephrinB-mediated TEC survival.

Immunology and Cell Biology (2013) 91, 130–138; doi:10.1038/icb.2012.59; published online 13 November 2012

Keywords: apoptosis; EphB; ephrinB; thymic epithelial cells; thymus

The thymus is a primary lymphoid organ involved in the functional maturation of lymphoid progenitor cells.¹ Its growth and maturation are determined by the balance between survival/death, proliferation and differentiation of different cell components, mainly thymocytes and thymic epithelial cells (TECs) that establish a continuous and specific crosstalk during thymus organogenesis.¹ Although all these processes are clearly known in the case of thymocytes,² we only partially understand the differentiation of TEC subsets^{1,3} and have some data on their proliferation levels.^{4–6} Very little is also known about the control of TEC survival. Cook (PhD thesis, University of Edinburgh, 2010) recently described a low apoptosis in the thymic epithelium, based on very few assays, and the tumour suppressor gene, p63, has been pointed out to be a key factor for controlling TEC survival.^{6,7} An increased TEC death in Hoxa3 and Pax1 double knockout mice⁸ and in mice deprived of BMP4 early in ontogeny has also been reported.⁹ Nevertheless, it is important to understand the mechanisms regulating the growth and size of the TEC compartment and its potential for regeneration following ageing or damage. In this respect, in this study, we demonstrate that Eph/ephrinB-mediated interactions between both thymocyte–TEC and among the different TECs are implicated in TEC survival in both embryonic and NB thymuses.

The Eph tyrosine kinase receptors and their ligands, ephrins, are molecules known to be involved in attachment/detachment processes, which are critical for the organization of normal and transformed epithelial tissues, and also for determining the cell fate of distinct lineages, cell proliferation and survival.^{10,11} Eph/ephrin interactions

are dependent on cell-to-cell contacts and generate bidirectional signals, forward in the case of Eph, and reverse in that of ephrin; hence, both molecules signal in the expressing cells.¹²

Certain EphB have a role in controlling proliferation and cell migration in different epithelia.¹³ We have, also, found profound alterations in the development and maturation of TECs in EphB2- and/or EphB3-deficient mice.¹⁴ In this study, we demonstrate a significantly increased apoptosis in the developing thymus of EphB2- and/or EphB3-deficient mice that largely affects the EpCAM⁺Ly51⁺ cortical epithelium and the EpCAM⁺MTS20⁺ progenitor cells. Furthermore, *in vitro*, both EphB and ephrinB activations decrease the proportion of apoptotic wild-type (WT) TECs, whereas the blockade of Eph/ephrinB signalling results in increased TEC death.

RESULTS

Fetal and NB thymuses of EphB2- and/or EphB3-deficient mice exhibit increased proportions of apoptotic epithelial cells

We comparatively analysed the proportions of apoptotic cells within the total EpCAM⁺CD45[−] TECs (Figure 1a), as well as in both cortical TECs (cTECs) (EpCAM⁺Ly51⁺) and medullary TECs (mTECs) (EpCAM⁺Ly51[−]), defined by the expression of glycoprotein Ly51 (Figure 1b).¹⁵ In general, the proportions of apoptotic TECs were low and varied throughout thymus organogenesis. In WT mice, the percentage of apoptotic TECs peaked at E13.5, decreased at E15.5 to gradually increase again and to reach a new peak in the NB thymus (Table 1a). Epithelial cell death in mutant mice followed the same

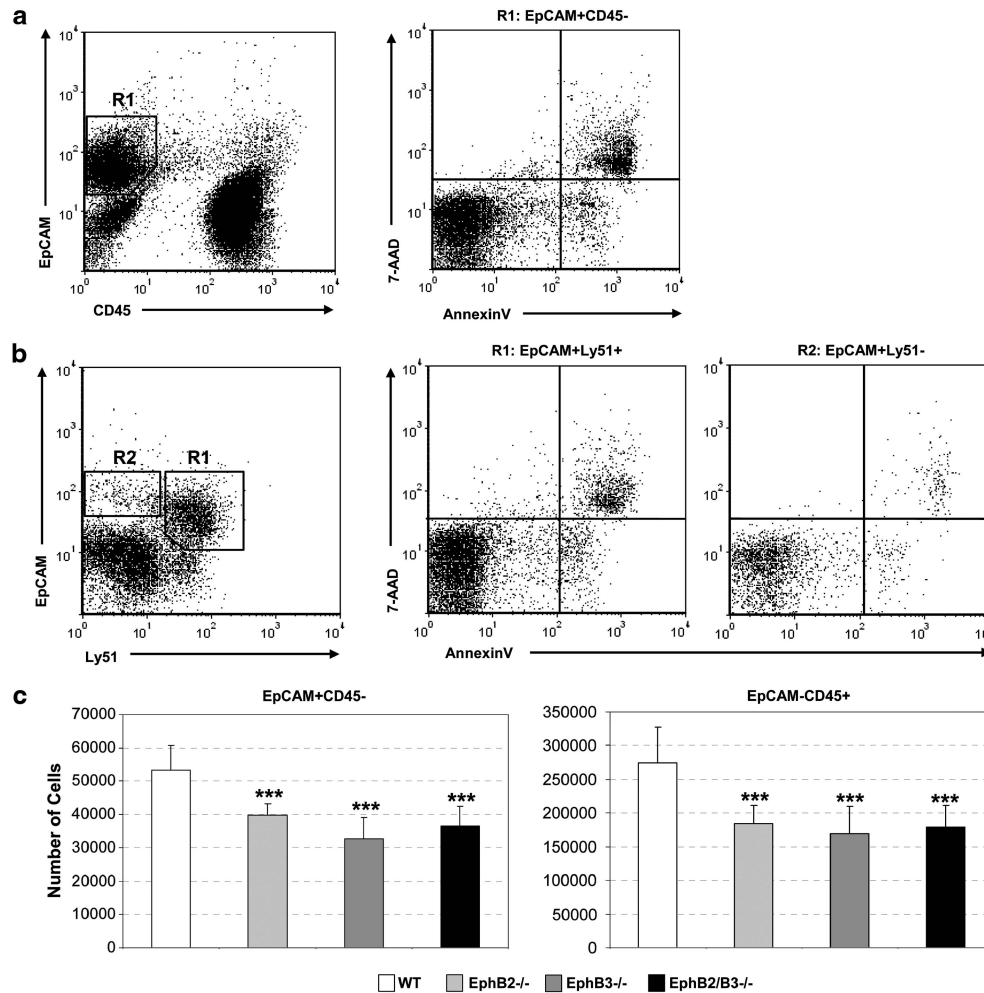


Figure 1 Analysis of apoptosis in different thymic epithelial cell subsets. (a) To determine the proportions of apoptotic cells in the total thymic epithelial cell population, cell suspensions were stained with anti-EpCAM and anti-CD45 antibodies and epithelial cells were defined as EpCAM⁺CD45⁻ (R1). (b) To analyse apoptosis in cortical and medullary TEC subpopulations, total cell suspensions were stained with anti-EpCAM and anti-Ly51 antibodies. Cortical epithelial cells were defined as EpCAM⁺Ly51⁺ cells (R1) and medullary TECs as EpCAM⁺Ly51⁻ cells (R2). Dot plots show a representative example carried out in E15.5 thymic lobes. (c) The figure shows an example at E15.5 of the decrease in the absolute number of total epithelial cells (EpCAM⁺CD45⁻) and lymphoid cells (EpCAM⁻CD45⁺) in EphB-deficient thymuses compared with WT values. Data represent the mean \pm s.d. of, at least, five independent animals. The significance of the Student's *t*-test probability is indicated: ****P* \leq 0.005.

pattern of evolution, but in all the stages studied, all tested EphB-deficient mice exhibited higher proportions of apoptotic epithelial cells than their respective control WT mice (Table 1a). As expected, increased proportions of apoptotic cells in EphB-deficient mice resulted in lower numbers of total EpCAM⁺CD45⁻TECs and lymphoid cells compared with numbers recorded in WT mice (Figure 1c), confirming our previous data on the smaller-sized thymuses of these mutants.¹⁴

Similar to the total EpCAM⁺CD45⁻ TEC population, the proportion of apoptotic EpCAM⁺Ly51⁺ cTECs in WT mice also decreased significantly between E13.5 and E15.5, and then gradually increased to peak in NB animals (Table 1b). Once again, all mutant mice showed increased proportions of apoptotic cTECs in all the stages studied compared with control values, and these correlated with an important decrease in the area occupied by the keratin 8⁺ (K8⁺) TECs (Figure 2a and b). Although in the early stages of thymus development K8 staining occurs throughout thymic parenchyma, it is later restricted to the thymic cortex. There were also statistically significant differences in the percentage of apoptotic

EpCAM⁺Ly51⁻ mTECs between mutant and WT thymuses in all the mutants studied (Table 1c). Indeed, as a consequence of the delayed maturation of thymic epithelial progenitor cells in EphB-deficient mice, the number of EpCAM⁺Ly51⁻ mTECs were particularly low at E13.5.¹⁴ Accordingly, the proportions of apoptosis showed significant differences between control and EphB2^{-/-} and/or EphB3^{-/-} mTECs, particularly from day 15.5 onward (Table 1c).

We further investigated whether the lack of EphB affected not only the survival of mature cTECs and mTECs but also that of thymic epithelial progenitor cells identified on the basis of the expression of both EpCAM and the cell marker MTS20 (Figure 3a). For this purpose, we comparatively evaluated the proportion of apoptotic EpCAM⁺MTS20⁺ cells in WT and EphB-deficient mice during the early stages of thymus development (E13.5–E15.5) when epithelial progenitor cells predominate in the thymic epithelium. In WT mice, a low proportion (2–3%) of thymic epithelial progenitor cells underwent apoptosis, whereas in EphB-deficient mice there was a very important increase in the apoptotic EpCAM⁺MTS20⁺ cell percentage at E14.5, which fell to control values one day later (Figure 3b).

Table 1 Percentage of apoptotic cells in the TEC fraction of WT and EphB2- and/or EphB3-deficient mice

	E13.5	E15.5	E17.5	NB
(a) % Of apoptosis in total TECs (EpCAM ⁺ CD45 ⁻)				
WT	4.69 ± 0.14	1.79 ± 0.37	3.73 ± 0.54	4.63 ± 0.73
EphB2 ^{-/-}	5.87 ± 0.82*	2.54 ± 0.30*	5.64 ± 0.57**	6.97 ± 0.53**
EphB3 ^{-/-}	6.07 ± 0.31**	3.82 ± 1.30*	6.18 ± 0.55**	6.70 ± 0.45**
EphB2/B3 ^{-/-}	5.50 ± 0.13*	3.15 ± 0.64*	5.68 ± 0.29**	7.48 ± 0.81***
(b) % Of apoptosis in cortical TECs (EpCAM ⁺ Ly51 ⁺)				
WT	4.84 ± 0.16	2.01 ± 0.35	3.96 ± 0.59	5.36 ± 0.71
EphB2 ^{-/-}	6.21 ± 1.19*	3.26 ± 0.58*	5.73 ± 0.67**	7.69 ± 0.68**
EphB3 ^{-/-}	6.79 ± 0.35**	4.13 ± 1.25*	6.33 ± 0.89**	7.53 ± 0.56**
EphB2/B3 ^{-/-}	5.85 ± 0.12*	3.32 ± 0.56*	5.73 ± 0.56**	8.35 ± 0.72***
(c) % Of apoptosis in medullary TECs (EpCAM ⁺ Ly51 ⁻)				
WT	0.70 ± 0.37	0.36 ± 0.22	0.83 ± 0.19	0.88 ± 0.09
EphB2 ^{-/-}	1.93 ± 0.41*	0.89 ± 0.28*	1.35 ± 0.28*	1.44 ± 0.35*
EphB3 ^{-/-}	1.48 ± 0.22*	1.50 ± 0.45*	1.52 ± 0.62*	1.47 ± 0.24*
EphB2/B3 ^{-/-}	1.26 ± 0.21*	1.87 ± 0.33**	1.77 ± 0.37*	1.55 ± 0.19*

Abbreviations: 7AAD, 7-amino-actinomycin-D; E, embryonic day; NB, newborn; TECs, thymic epithelial cells.

Data show the percentages of apoptosis in total EpCAM⁺CD45⁻ TECs (a) either in EpCAM⁺Ly51⁺ cortical TECs (b) or in EpCAM⁺Ly51⁻ medullary TECs (c). Notice the increased values of apoptosis in the EphB-mutant lobes in all developmental stages for total, cortical and medullary TECs compared with WT values. Apoptotic cells were defined as AnnexinV⁺/7AAD⁻. In the three TEC populations, the proportions of apoptotic cells are significantly higher in mutant than in WT mice. Data represent the mean ± s.d. of, at least, five independent animals. The significance of the Student's *t*-test probability is indicated as follows: **P* ≤ 0.05; ***P* ≤ 0.01; ****P* ≤ 0.005.

In situ evaluation of TEC apoptosis

To avoid a presumptive high sensitivity of EphB-deficient TECs to the enzymatic treatment for preparing cell suspensions for fluorescence-activated cell sorter analysis, we confirmed our results by performing terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) assays on *in situ* cryosections. We observed an increase in the total TUNEL⁺ cell number (data not shown) as well as increased numbers of TUNEL⁺K8⁺ TECs per mm² of thymic section, confirming a lower TEC survival in mutant thymuses than in WT ones (Figure 3c and d).

Eph/ephrinB signalling-mediated thymocyte-TEC interactions affect TEC survival

To confirm whether Eph/ephrinB signalling controls TEC survival, we established reaggregate thymus organ cultures (RTOCs) with E14.5 WT TECs and total WT thymocytes isolated from 2-month-old WT mice in the presence of either soluble 10 µg ml⁻¹ ephrinB1-Fc or EphB2-Fc fusion proteins, which *in vitro* block Eph/ephrinB interactions,¹⁶ using human immunoglobulin G (IgG) protein as a control. After 48 h of culture, the survival of EpCAM⁺CD45⁻ TECs obtained from the cell suspensions yielded by RTOCs was determined by flow cytometry using AnnexinV and 7-amino-actinomycin-D (7AAD) staining. In all experimental conditions, RTOCs grown in the presence of either EphB2-Fc or ephrinB1-Fc proteins showed increased proportions of AnnexinV⁺/7AAD⁻ apoptotic cells and lower TEC numbers when compared with those observed in control cultures supplied with human IgG proteins (Table 2a).

To further analyse the importance of Eph/ephrinB interactions in TEC survival, we assayed whether the activation of Eph/ephrinB signalling restored TEC survival (Table 2b). Then, we cultured WT TECs isolated from 2-deoxiguanosine (2-dGuo)-treated E14.5 thymus lobes in the presence of either immobilized, activating ephrinB1-Fc,

EphB2-Fc or human IgG proteins. After 24 h of culture, secondary necrotic cells were discarded and the proportions of yielded apoptotic EpCAM⁺CD45⁻ cells were analysed. EphrinB1-Fc or EphB2-Fc protein treatment significantly reduced the proportions of apoptotic epithelial cells in the cultures permitting the recovery of higher numbers of TECs (Table 2b). These results demonstrate, as previously reported for thymocytes,^{16,17} the importance of Eph/ephrinB signalling for the control of TEC survival.

EphB2 and EphB3 receptor-mediated heterotypic interactions between TECs and thymocytes are involved in epithelial survival

Our results demonstrated that Eph/ephrinB signalling have a role in the survival of TECs, but did not determine whether this effect was cell autonomously or non-cell autonomously mediated nor which signals, forward or reverse, affected TEC survival. We, therefore, comparatively analysed the apoptotic TECs yielded after 48 h of culture by RTOCs established between WT thymocytes and EphB-defective TECs, and *vice versa* (Table 3a and b). Figure 4 explains the different cell combinations and the transmitted signals involved in these experiments. When RTOCs were established with EphB2- and/or EphB3-deficient TECs and total WT thymocytes (Figure 4 (a-1)), increased proportions of apoptotic TECs (EpCAM⁺CD45⁻) and decreased numbers of recovered cells were found compared with the values observed in control RTOCs established with both WT TECs and thymocytes (Figure 4 (a-0) and Table 3a). In all cases, the percentages of apoptotic and TEC numbers were similar using EphB2- and/or EphB3-deficient stroma. When RTOCs were established with TECs isolated from EphB2LacZ mice, which express a truncated form of EphB2 that does not transmit forward signals to EphB2LacZ-expressing TECs, but activates ephrinB expressed on thymocytes and transmits a reverse signal to them (Figure 4 (a-2)), the percentage of apoptotic TECs remained significantly higher and the TEC number lower than in the controls (Table 3a). These results suggest that the presence of a reverse signal in thymocytes does not improve TEC survival, emphasizing the relevance of EphB2 forward signals for the control of TEC survival and, therefore, the cell-autonomous nature of the process.

On the other hand, EpCAM⁺CD45⁻ epithelial cells from RTOCs established with WT TECs and EphB-deficient thymocytes (Table 3b), in which the first ones receive Eph forward, but not ephrin reverse signals (Figure 4 (b-1)), showed, in all cases, significantly increased proportions of apoptotic and reduced numbers of TECs (Table 3b). These results demonstrated that only EphB2 and/or EphB3 forward signalling in TECs is not sufficient to recover epithelial cell survival. Confirming these results, TECs from RTOCs established with WT TECs and EphB2LacZ thymocytes, which exhibit both forward and reverse signalling (Figure 4 (b-2)), recovered control values of TEC apoptosis and cellularity (Table 3b), demonstrating the importance of ephrinB reverse signals in TEC for their survival. Taken together, these results suggest that both forward and reverse signals transmitted through Eph and ephrinB expressed on TEC contribute to TEC survival in a cell-autonomous process.

EphB2- and/or EphB3-mediated homotypic interactions between distinct TECs are also important for the survival of TECs

Our results demonstrate that Eph/ephrinB-mediated heterotypic interactions between thymocytes and TECs are important for TEC survival, but, in physiological conditions, TECs, which express both Eph and ephrinsB,¹⁸ also establish mutual interactions to constitute a thymic epithelial network. Accordingly, it was important to determine whether Eph/ephrinB-mediated homotypic interactions between

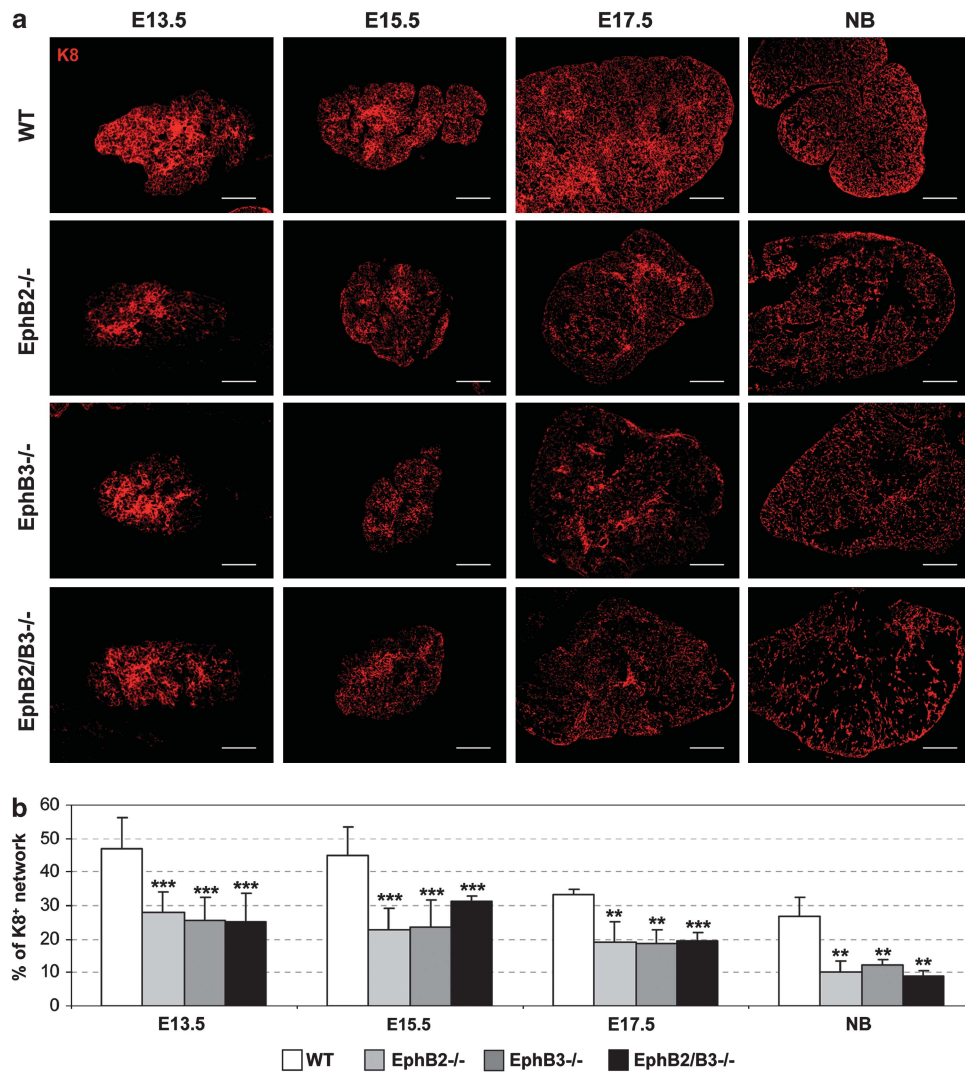


Figure 2 A reduced K8⁺ epithelial network occurs in EphB-deficient mice. (a) Representative thymic sections of either WT and EphB-deficient mice of different ages stained for K8 cortical marker. In all studied stages, there was a reduction in the K8⁺ epithelial cell network in EphB-mutant thymuses compared with WT ones. Images are representative of, at least, three independent lobes. (b) The K8⁺ epithelial network is represented in pixels. The reduced area occupied by the K8⁺ network in the EphB2^{-/-} and/or EphB3^{-/-} thymuses correlates with the increased proportions of apoptotic EpCAM⁺Ly51⁺ cTECs shown in Table 1b. Data represent the mean \pm s.d. of, at least, 10 sections of three independent thymic lobes. The significance of the Student's *t*-test probability is indicated: ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.005$. Scale bars: E13.5, 100 μ m; E15.5, E17.5 and NB, 200 μ m.

distinct TECs could also contribute to TEC survival. RTOCs were then established only with WT or the different EphB-deficient TECs, in the absence of thymocytes, obtained from 2-dGuo-treated, then trypsin-digested fetal thymus organ cultures (FTOCs) and re-aggregated again. When RTOCs were performed only with EphB2^{-/-} and/or EphB3^{-/-} TECs, which receive neither forward nor reverse signals (Figure 4 (c-1)), the proportions of apoptotic cells were higher and the recovered cell number lower than those observed in WT RTOCs (Table 3c). On the other hand, RTOCs established only with EphB2LacZ TECs, which only receive reverse, but not EphB2 forward signals (Figure 4 (c-2)), showed increased proportions of apoptotic TECs and, accordingly, reduced cell content compared with those formed with WT TECs, indicating again that reverse signalling alone is not capable of restoring TEC survival (Table 3c). These results, therefore, support that EphB2^{-/-} and/or EphB3^{-/-} mediated interactions between different TECs are important for epithelial survival. However, those established between thymocytes and TECs

seem to be more relevant because the proportion of apoptotic TECs was higher when lymphoid cells had been eliminated from the RTOCs (to compare, see Table 3a–c).

DISCUSSION

The thymuses of EphB2^{-/-} and/or EphB3^{-/-} deficient mice show profound hypocellularity that affects both thymocytes and TECs.^{14,18} In previous studies, we have shown that reduced numbers of thymocytes in these mutants correlated with increased apoptosis, decreased numbers of cycling cells¹⁸ and a certain capacity of bone marrow cell progenitors to colonize the thymic primordium.¹⁹ However, the reason for the decrease in TEC numbers, evidenced from early ontogeny,¹⁴ had not been examined. In this study, we demonstrate that fetal and NB thymuses of EphB2^{-/-} and/or EphB3^{-/-} deficient mice exhibit higher proportions of apoptotic epithelial cells than WT mice. This increased apoptosis largely occurs not only in the EpCAM⁺Ly51⁺ cTECs but also in the EpCAM⁺MTS20⁺

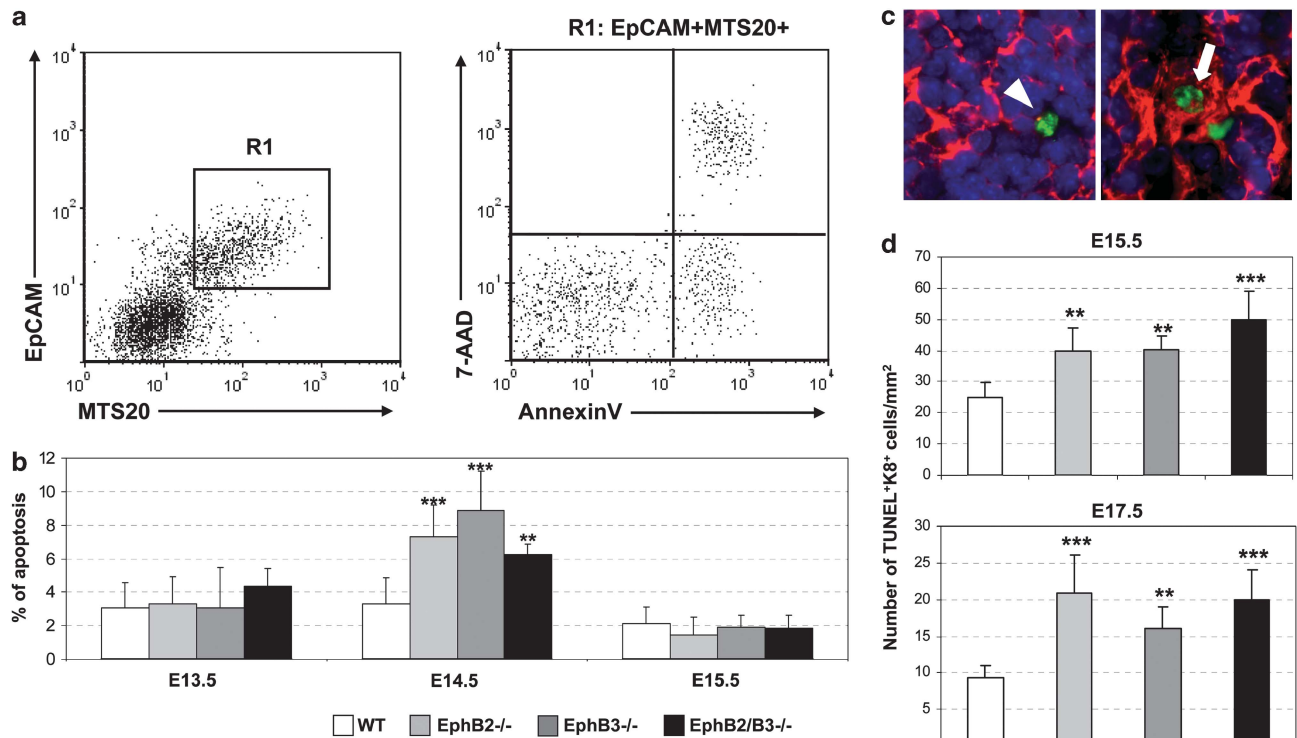


Figure 3 Apoptosis of TEC progenitors and *in situ* thymic cell death analysis. (a) To determine the proportions of apoptotic epithelial progenitor cell, suspensions isolated from either mutant or WT mice were stained with anti-EpCAM and anti-MTS20 supernatants. Epithelial progenitor cells were defined as EpCAM⁺MTS20⁺ (R1); the dot plot shows a representative example of these cells in E13.5 WT thymic lobes. The proportions of apoptotic cells were determined gating in the marked region. (b) The proportions of apoptotic EpCAM⁺MTS20⁺ cells were evaluated at E13.5–E15.5. Results indicate that EphB-deficient progenitor cells undergo a significant increase in apoptosis at E14.5, but have normal values at E13.5 and E15.5 with respect to WT progenitor cells. Data represent the mean \pm s.d. of, at least, five independent animals. (c) Images show both apoptotic TUNEL⁺K8⁺ (arrowhead) and epithelial TUNEL⁺K8⁺ cells (arrow) (K8, red; TUNEL, green; Hoechst33342, blue). (d) Numbers of TUNEL⁺K8⁺ cells per mm² in both E15.5 and E17.5 mutant and WT thymuses. In both stages, increased numbers of apoptotic K8⁺ cells were observed *in situ* in all EphB-deficient mice. Data represent the mean \pm s.d. of, at least, 10 sections of three independent thymic lobes. The significance of the Student's *t*-test probability is indicated: ***P* \leq 0.01; ****P* \leq 0.005.

Table 2 Blockade and activation of Eph/ephrinB signalling affects the survival of TECs

	IgG	ephrinB1-Fc	EphB2-Fc
(a) RTOCs treated with ephrinB1-Fc or EphB2-Fc			
% Apoptotic TECs	5.41 \pm 1.29	8.23 \pm 1.41**	8.17 \pm 0.93**
Recovered TECs (10 ³)	4.61 \pm 0.72	2.98 \pm 0.85*	2.71 \pm 0.76**
(b) TECs stimulated with ephrinB1-Fc or EphB2-Fc			
% Apoptotic TECs	38.36 \pm 3.12	31.21 \pm 1.73**	32.50 \pm 2.02*
Recovered TECs (10 ³)	2.36 \pm 0.02	2.84 \pm 0.07**	2.80 \pm 0.15*

Abbreviations: 2-dGuo, 2-deoxyguanosine; Ig, immunoglobulin; RTOCs, reaggregate thymus organ cultures; TECs, thymic epithelial cells. (a) The treatment of RTOCs established with 2.5×10^5 adult thymocytes and the same number of E14.5 TECs, with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of either soluble ephrinB1-Fc or EphB2-Fc fusion proteins, which block Eph/ephrinB signalling, during 48 h increased the percentage of apoptotic EpCAM⁺CD45⁺ cells and reduced the number of TECs recovered as compared with RTOCs receiving control IgG proteins. (b) The activation of Eph/ephrinB signalling rescues TECs from apoptosis. WT TECs isolated from E14.5 2-dGuo-treated thymic lobes were cultured in the presence of either $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ immobilized ephrinB1-Fc, EphB2-Fc fusion proteins or human IgG. After 24 h, the activation of Eph/ephrinB signalling by either ephrinB1-Fc or EphB2-Fc fusion proteins resulted in a reduction of the proportions of apoptotic EpCAM⁺CD45⁺ TECs together with a higher number of recovered TECs in treated than in WT RTOCs. Data represent the mean \pm s.d. of, at least, five independent assays. The significance of the Student's *t*-test probability is indicated as follows: **P* \leq 0.05; ***P* \leq 0.01.

epithelial progenitor cells, which predominate in the early stages of thymus development in these mutant mice.¹⁴ A high number of apoptotic cortical TECs, corroborated by increased TUNEL⁺K8⁺

cells *in situ* observed in the EphB-deficient thymuses, correlates with a reduction in the K8⁺ epithelial network. K8 is a cell marker mainly expressed by cTECs, although there is a minor K8⁺ medullary epithelial cell subset.²⁰ In our study, we do not distinguish between the two K8⁺ cell subsets, but the K8⁺ medullary cell population is lower than the K8⁺ cortical cells, particularly during fetal and neonatal life.

Very few studies have focused on analysing the mechanisms and the physiological significance of the survival/death of TECs. Cook (PhD thesis) pointed out that a low percentage of apoptosis in TECs (in the range of 2–4%) does not significantly affect thymus homeostasis. However, it is important to highlight the occurrence of efficient clearance mechanisms of dead cells in the thymus that could mask the real levels of apoptosis.⁶ Several molecules, some of them directly or indirectly related to Eph/ephrins (see below), have been claimed to be involved in the control of TEC survival. A homologue of the p53 tumour suppressor gene, p63, has a central role in maintaining thymic epithelial progenitor cells,^{6,7} and fetal and neonatal mice lacking p63 show a hypoplastic thymus with increased apoptotic epithelial cells.⁶ Remarkably, FGFR2IIIb, a receptor for FGF7 and FGF10, two proliferating factors produced by the thymic mesenchyme, expressed on TECs is a direct target of p63.⁵ In addition, epithelial cell death increased by approximately fourfold in the thymus of Hoxa3^{+/−}Pax1^{−/−} mutant mice⁸ and, recently, the loss of BMP4 from the pharyngeal epithelium and surrounding

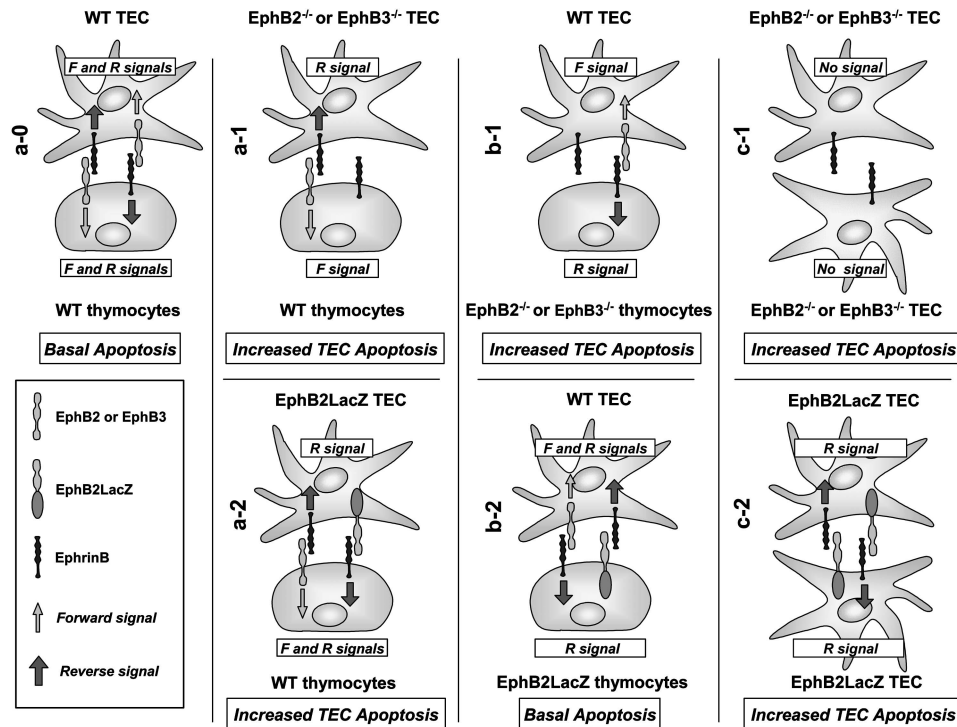


Figure 4 Patterns of Eph/ephrinB signalling that occur in RTOCs established with thymocytes and TECs or with TECs alone. (a-0) In RTOCs established with WT thymocytes and WT TECs, both cell types express EphB2, EphB3 and ephrinB and receive both forward (F) and reverse (R) signals. (a-1) In RTOCs established with WT thymocytes and EphB-deficient TECs, the latter receive ephrinB reverse, but not EphB forward signals, whereas thymocytes only receive forward, but not reverse signals. (a-2) In RTOCs established with WT thymocytes and EphB2LacZ TECs, the epithelial cells receive reverse, but not forward signals, whereas WT thymocytes receive both types of signals. (b-1) In RTOCs established with EphB-deficient thymocytes and WT TECs, TECs receive forward, but not reverse signals, whereas, on the contrary, thymocytes receive reverse, but not forward signals. (b-2) RTOCs established with EphB2LacZ thymocytes and WT TECs. In these conditions, TECs receive both reverse and forward signals, but thymocytes only receive reverse ones. (c-1) In RTOCs established only with EphB-deficient TECs, the cells do not receive any Eph/ephrinB-mediated signal. (c-2) Cells from RTOCs established only with EphB2LacZ TECs receive only reverse, but not forward signals.

mesenchyme was demonstrated to result in a dramatic increase in apoptotic embryonic TECs.⁹

There is no clear explanation, however, for the physiological significance of the programmed cell death of epithelium during thymus ontogeny. According to our results, the proportions of WT apoptotic TECs peak at E13.5, later decrease and gradually increase again to peak in NB mice. It is possible then to speculate that the pattern of apoptosis in the epithelial cell compartment during thymus ontogeny may be associated with processes occurring concomitantly in the organ. Thus, high proportions of apoptotic TECs could be related to the arrival of lymphoid progenitors to the thymic primordium²¹ or the remodelling of thymic epithelium due to establishment of the vascular network.²² Lymphoid precursors invade the thymic primordium around E12.5 and onwards, and establish necessary lympho-epithelial interactions for organizing a three-dimensional network, which is essential for thymic functioning.²¹ To our knowledge, there are no data, however, on the role played by these interactions in TEC survival, but a good correlation has been reported between increased proliferative activity of TECs and colonization of the thymic primordium by the first wave of lymphoid progenitors.²³ Our current results demonstrate that Eph/ephrinB signalling-mediated thymocyte–TEC interactions are particularly important for controlling TEC survival because the presence of thymocytes contributes to recover TECs from cell death (see later). By contrast, the distribution of mesenchyme in the thymus primordium

changes dramatically around E13.5 when surrounding mesenchyme cells invaginate into the epithelial anlage²⁴ differentiating into perivascular cells and then into mature blood vessels.²²

EphB2- and/or EphB3-deficient fetal and NB mice show increased proportions of apoptotic TECs compared with the respective WT mice. In addition, *in vitro* blockade of EphB/ephrinB signalling in RTOCs established between E14.5 WT TECs and adult WT total thymocytes with either soluble ephrinB1-Fc or EphB2-Fc fusion proteins increases TECs death, in agreement with the observed reduction in the number of TECs, whereas its activation decreases the proportion of dying TECs and increases TEC numbers. However, in other mice deficient in molecules involved in thymus development (that is, TGF β , Wnt) that exhibit similar thymic epithelium phenotypes to those described in EphB2- and/or EphB3-deficient mice,¹⁴ the proportions of apoptotic cells have not been found to increase.^{25–27} The deletion of Rac-1, a GTPase involved in the signalling downstream of Eph receptors, in K14- or K5-expressing epithelial cells, which courses with failure of thymus organogenesis with loss of corticomedullary organization and increased numbers of double-negative thymocytes, provokes increased apoptosis of TECs.²⁸ We are currently evaluating Rac-1 expression in the thymus of EphB-deficient mice because both Rac-1 activation and inhibition have been reported after Eph signalling.¹² The increased apoptosis of TECs observed in our study seems to be a specific consequence of the lack of Eph/ephrin signalling. In agreement, previous evidence confirms

Table 3 Eph/ephrinB signalling is involved in TEC survival

	WT	EphB2 ^{-/-}	EphB2LacZ	EphB3 ^{-/-}	EphB2/B3 ^{-/-}
(a) RTOCs established with WT thymocytes and different TECs					
% Apoptotic TECs	4.90 ± 0.88	7.42 ± 1.14**	7.07 ± 0.90***	6.83 ± 0.90***	7.57 ± 1.28*
Recovered TECs (10 ³)	3.75 ± 0.48	2.40 ± 0.58***	2.50 ± 0.40***	2.50 ± 0.37***	2.31 ± 0.17***
(b) RTOCs established with different thymocytes and WT TECs					
% Apoptotic TECs	5.35 ± 0.32	7.70 ± 1.36**	5.78 ± 0.77	6.96 ± 0.47***	6.52 ± 0.33**
Recovered TECs (10 ³)	3.88 ± 0.29	2.56 ± 0.29***	3.61 ± 0.96	2.60 ± 0.35***	2.66 ± 0.63*
(c) RTOCs established only with different TECs					
% Apoptotic TECs	11.93 ± 2.77	17.90 ± 2.10***	20.79 ± 1.44***	18.09 ± 3.52**	18.66 ± 1.80***
Recovered TECs (10 ³)	0.85 ± 0.08	0.68 ± 0.08***	0.53 ± 0.09**	0.70 ± 0.06***	0.73 ± 0.08*

Abbreviations: RTOCs, reaggregate thymus organ cultures; TECs, thymic epithelial cells; WT, wild type.

(a and b) The 2.5×10^5 cell thymocytes and the same number of TECs were reaggregated and cultured during 48 h. When RTOCs were established with WT thymocytes and either EphB2- and/or EphB3-deficient TECs (a), the proportions of apoptotic EpCAM⁺CD45⁻ cells increased, whereas the recovered TEC number of TECs decreased compared with WT RTOCs. A similar result was obtained when RTOCs were established with EphB2LacZ TEC (cells capable of stimulating ephrinB-expressing cells, but unable to transmit forward signals to TECs), revealing the importance of EphB2 forward signalling in TEC survival. On the other hand (b), when RTOCs were established with WT TECs and EphB2- and/or EphB3-deficient thymocytes, where epithelial cells are able to receive Eph forward, but not ephrinB reverse signals, the percentage of apoptotic EpCAM⁺CD45⁻ epithelial cells also increased. On the contrary, in RTOCs containing EphB2LacZ thymocytes capable of transmitting reverse signals to TECs, there were no significant variations in the percentage of apoptotic TECs and TEC numbers compared with the control WT RTOCs, thus demonstrating the importance of ephrinB reverse signalling for TEC survival. (c) RTOCs established with either 2.5×10^5 WT TECs or EphB2- and/or EphB3-deficient TECs and cultured during 48 h. Increased proportions of apoptotic EpCAM⁺CD45⁻ TECs and reduced numbers of recovered TECs occurred in RTOCs established with EphB2- and/or EphB3-deficient TECs compared with those found in RTOCs containing WT TECs. Also, RTOCs established with EphB2LacZ TECs exhibited increased percentages of apoptotic TECs and reduced cell numbers than control RTOCs, thus demonstrating the importance of EphB2 forward signalling. Apoptotic cells were defined as AnnexinV⁺/7AAD⁻. Data represent the mean ± s.d. of, at least, five independent RTOCs. The significance of the Student's *t*-test probability is indicated as follows: **P* ≤ 0.05; ***P* ≤ 0.01; ****P* ≤ 0.005.

that these molecules have a role in the survival of different cell types, although the results are controversial.^{29,30}

EphA4 can initiate cell death in the absence of its ligand ephrinB3 and, in the adult subventricular zone, the ephrinB3 abolishing results in increased cell death.¹¹ On the contrary, *in vivo* stimulation of EphA7 through ectopic overexpression of ephrinA5 in the embryonic cortex and *in vitro* challenge of EphA7⁺ cortical progenitors with clustered ephrinA5-Fc fusion proteins induced apoptosis of neural progenitors.¹⁰ This same study reported about a twofold decrease in cortical progenitor cell death at mid-neurogenesis in EphA7^{-/-} mice.¹⁰ By contrast, reduced proliferation in colon crypts in mice lacking EphB2 and EphB3 does not course with an increased number of dying cells and the apoptotic cell death in crypts was not significantly affected by the inhibition of EphB signalling in ephrinB2-Fc-injected mice.¹³ It is important to remark that some authors have reported no thymus phenotypes in mice deficient in different Eph and ephrins.¹⁹ Particularly important for the scope of this study is the recently reported lack of alterations in the thymus of mice, which show the specific deletion of ephrinB2 in interleukin-7-producing TECs.³¹ In this study, however, the condition of the thymic epithelium is not analysed and described variations in the TCRβ⁺ cell populations are not statistically evaluated. On the contrary, we have found profound alterations in the thymus phenotypes of mice showing conditional ephrinB1 and/or ephrinB2 deletion in K5⁺ TECs (Cejalvo, PhD thesis, Complutense University of Madrid, 2011). The high phenotypic variability observed in Eph/ephrin-deficient mutants and differences in the time of ephrinB2 deletion could explain the different results; whereas ephrinB2 deletion under the control of interleukin-7 promoter occurs around E12.5–13, when interleukin-7 expression begins,³ the keratin 5 gene is expressed earlier on day 11 in all TECs of the thymic primordium.¹⁴

In the case of T lymphocytes, most results support that Eph/ephrin signalling rescues from apoptosis, whereas its blockade, or the lack of signalling, increases apoptosis. EphA4^{-/-} mice exhibit increased numbers of apoptotic thymocytes³² and FTOCs treated with either blocking soluble EphA1-, A2-, A3-Fc or ephrinA1-Fc fusion proteins yield increased apoptotic thymocytes.¹⁷ In addition, stimulation of

murine thymocytes with ephrinA attenuates TCR-mediated induced apoptosis³³ and the crosslink of EphB2 with ephrinB1 protects thymocytes from anti-CD3-induced apoptosis.^{34,35} On the contrary, it has also been reported that anti-EphB6 antibodies in the presence of suboptimal doses of anti-CD3 reagents increase cell death.³⁶ Indeed, comparing results is difficult because assayed cell types and experimental models are very different. In this respect, we demonstrated that the effects of Eph/ephrinB on the apoptosis of thymocytes are dependent on the density of immobilized fusion proteins, which result in increased proportions of apoptotic double-positive thymocytes that later decrease.¹⁶

We further evaluate the relevance of forward and reverse signalling transmitted through EphB- or ephrinB-expressing cells, respectively, for TEC survival establishing RTOCs with different combinations of WT and EphB-deficient TECs and total thymocytes. Our results indicate that TEC survival is a cell-autonomous process that needs both EphB forward and ephrinB reverse signals in the heterotypic interactions mediated by thymocytes and TECs. In addition, we studied the influence of mutual TEC–TEC interactions because thymocyte–TEC interactions become important during thymus ontogeny just after the colonization of the thymic primordium by lymphoid progenitors but not earlier.²¹ Again, the lack of forward and reverse signalling in RTOCs established with EphB-deficient TECs courses with increased apoptosis, and the presence of only reverse signals in RTOCs formed with EphB2LacZ TECs does not rescue from cell death, and thus reinforcing the relevance of forward signalling. Furthermore, thymocyte–TEC interactions seem to be more important than those established between TECs because in RTOCs devoid of thymocytes, the proportions of apoptotic cells are higher than those found in RTOCs established with total thymocytes and TECs, resulting in reduced numbers of TECs in the first ones. This supports the importance of thymocyte–TEC interactions in thymus development as it has been previously claimed by many other authors.²¹

In summary, these results support a role for Eph/ephrinB in the control of TEC survival, adding new functions for these molecules in the thymus glands, apart from those reported previously,¹⁹ such as their involvement in the lymphoid colonization of the thymic

primordium, the migration of thymocytes throughout distinct thymic territories, the regulation of keratin expression by TECs and the organization of thymic cortex and medulla. Taken together, these data show that Eph/ephrins are a particularly important family of molecules in thymus gland biology.

METHODS

Mice

EphB2⁻³⁷ and/or EphB3⁻³⁸ deficient mice, as well as those expressing EphB2LacZ³⁷ in a CD1 background were generously provided by Dr Mark Henkemeyer (University of Texas, Southwestern Medical Centre, Dallas, TX, USA). The EphB2LacZ mice expressed a truncate EphB2 molecule fused to β -galactosidase capable of stimulating ephrinB-expressing cells, but were unable to transmit EphB2 forward signals. For *in vivo* cell death analysis, WT and mutant mice were obtained from heterozygous parents and *in vitro* assays, based on RTOCs that used CD1 WT and EphB-deficient mice obtained from homozygous parents. In the studies using embryonic mice, the day of vaginal plug detection was designated as day 0.5. At least five animals (WT and mutants) were used for each experimental group. All animals were bred and maintained under pathogen-free conditions in the animal care facilities of the Complutense University of Madrid.

Cell suspensions and cell death analysis

Thymuses from mice at different developmental stages (embryonic day (E): 13.5, 14.5, 15.5, 17.5 and NB) or RTOCs (see below) were disaggregated using trypsin 1 \times (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) in RPMI 1640 during 20 min at 37 °C and later gently pipetted to obtain a single-cell suspension. Before this, the counting cells were washed, resuspended in RPMI 1640 with 5% fetal calf serum and 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and then stained for 15 min at 4 °C with different fluorochrome-conjugated antibodies (anti-CD326 (EpCAM, clone G8.8), anti-Ly51 (clone 6C3), anti-CD45 (clone 30-F11) (BioLegend, San Diego, CA, USA) and MTS20 supernatant (kindly provided by Dr Richard Boyd)) and AnnexinV at room temperature (BioLegend). MTS20 expression was detected using an anti-ratIgM antibody (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA). Secondary necrotic cells were discarded for analysis after staining with 7AAD (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). AnnexinV⁺/7AAD⁻ cells were considered to be apoptotic cells. Cell analysis was performed in a FACSCalibur device (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) equipped with CellQuest software from the Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre (Complutense University, Madrid, Spain). Non-viable cells were excluded by forward-side scatter in all cases.

Immunofluorescence studies

Thymic sections of 6 μ m thickness from either WT or EphB-deficient E13.5, E15.5, E17.5 or NB mice were fixed in acetone for 10 min and air dried. Cryosections were stained with both anti-K8 (Troma-1; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) and anti-K5 (Covance, Berkeley, CA, USA) monoclonal antibodies. Primary antibodies were incubated during 1 h at room temperature. After being washed three times in cold phosphate-buffered saline (PBS), staining was detected using an anti-ratIgG^{TexasRed} and anti-rabbitIgG^{Alexa488} antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), and incubated during 45 min at room temperature. Sections were then washed in cold PBS three times during 5 min and mounted with antifade Prolong Gold (Molecular Probes). Sections were observed and photographed in a Zeiss Axioplan microscope provided with a Spot 2 digital camera at the Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre (Complutense University).

Quantitative analysis of K8⁺ areas of thymus lobes

A minimum of 10 non-overlapping serial sections (6 μ m thick) from each thymus lobe of at least three different animals were analysed. The quantitative analysis of K8⁺ epithelial cell areas was carried out using Adobe Photoshop CS3 software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). In this analysis, we included all K8⁺-expressing cells occurring in both mutant and WT thymuses, independently of the levels of cell marker expression. For each image, we

calculated the K8⁺-stained pixels, excluding K5⁺K8⁺ cells, and divided by the total thymic area analysed.

In situ cell death analysis (TUNEL assay)

Thymic cryosections of 6 μ m thickness from E15.5 and E17.5 WT and mutant mice were fixed in cold 4% paraformaldehyde during 5 min. Sections were rinsed in cold PBS three times during 5 min, and then treated with cell permeabilization solution (0.1% sodium citrate with 0.1% Triton X-100) for 2 min on ice, again rinsed twice (for 5 min each) and incubated for 1 h in a humidified chamber at 37 °C with the TUNEL reaction mixture (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the supplier's instructions. Samples were then washed three times for 5 min in PBS, and stained with an anti-K8 monoclonal antibody, as described above. Cell nuclei were detected by staining with Hoechst 33342 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA). For this analysis, we evaluated a minimum of 10 non-overlapping serial sections from each thymus lobe of at least three different animals. We calculate the number of dead TECs, defined as TUNEL⁺K8⁺ per mm².

Reaggregate thymus organ cultures

TECs were obtained from 2-dGuo-treated E14.5 thymic lobes from either WT, EphB2^{-/-}, EphB3^{-/-}, EphB2/B3^{-/-} or EphB2LacZ mice, as described previously.³⁹ Total thymocytes were isolated from either WT or EphB-deficient 2-month-old mice. To determine the role of heterotypic cell interactions in TEC apoptosis, thymocytes and TECs were mixed together by centrifugation (10 min at 4 °C) at a 1:1 ratio (total number of cells 5 \times 10⁵) and the pellet was transferred to 2- μ m polycarbonate filters in organ cultures on RPMI 1640 with 10% fetal calf serum cell culture medium. The role of homotypic interactions in TECs death was analysed in RTOCs established only with WT or EphB-deficient TECs (total number of cells 2.5 \times 10⁵). To evaluate the effects of the blockade of Eph/ephrinB signalling by soluble fusion proteins, RTOCs were established with WT TECs and total thymocytes. Each cell type was treated before reaggregation with 10 μ g ml⁻¹ of either ephrinB1-Fc, EphB2-Fc (R&D Systems, Oxon, UK) or purified human IgG (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) during 45 min at 4 °C. In all cases, RTOCs were cultured during 48 h in a medium containing the fusion proteins and were then processed for the apoptosis assay as described above. To evaluate treatments in the same experimental conditions in all cases, the cell suspensions were acquired for 150 s with uniform flow and the non-viable cells were excluded by forward-side scatter.

Activation of Eph/ephrinB signalling in TECs

Flat-bottomed culture plates (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) were coated with 50 μ l of either ephrinB1-Fc, EphB2-Fc (R&D Systems, Oxon, UK) or purified human IgG (10 μ g ml⁻¹) (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) proteins on gelatine 1% (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Fusion proteins were incubated during 2 h at 37 °C and then plates were rinsed with PBS three times. A total of 1.0 \times 10⁵ WT total TECs from 2-dGuo-treated E14.5 thymic lobes depleted of thymocytes, as described previously, were plated and incubated in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. After 24 h, cells were detached using trypsin 1 \times in RPMI 1640, washed and their levels of apoptosis analysed by flow cytometry, as described previously. In all cases, the cell suspensions were acquired for 150 s with uniform flow. Non-viable cells were excluded by forward-side scatter.

Statistical analysis

The results were expressed as means \pm s.d. The statistical significance of differences compared with control values was analysed using the Student's *t*-test and indicated as follows: **P* \leq 0.05; ***P* \leq 0.01; ****P* \leq 0.005.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grants BFU2007-65520 and BFU2010-18250 from the Spanish Ministry of Education and Science, RD06/0010/0003 from the

Spanish Ministry of Health and Consumption and GR35/10A-910552 from the Complutense University and the Regional Government of Madrid. We thank Dr Mark Henkemeyer for providing EphB-deficient mice and the Microscopy and Cytometry Centre in the Complutense University for the use of its facilities and technical assistance. We also thank the 'Developmental Studies Hybridoma Bank' of the University of Iowa for supplying anti-K8 antibody.

- 1 Gordon J, Manley NR. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* 2011; **138**: 3865–3878.
- 2 Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 649–679.
- 3 Alves NL, Huntington ND, Mention JJ, Richard-Le Goff O, Di Santo JP. Cutting edge: a thymocyte–thymic epithelial cell cross-talk dynamically regulates intrathymic IL-7 expression *in vivo*. *J Immunol* 2010; **184**: 5949–5953.
- 4 Gray DH, Seach N, Ueno T, Milton MK, Liston A, Lew AM *et al*. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 2006; **108**: 3777–3785.
- 5 Dooley J, Erickson M, Larochelle WJ, Gillard GO, Farr AG. FGFR2IIIb signaling regulates thymic epithelial differentiation. *Dev Dyn* 2007; **236**: 3459–3471.
- 6 Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* 2007; **129**: 523–536.
- 7 Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Giamboni-Miraglia A, Lena AM, Mantovani R *et al*. DeltaNp63 regulates thymic development through enhanced expression of Fgfr2 and Jag2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 11999–12004.
- 8 Su D, Ellis S, Napier A, Lee K, Manley NR. Hoxa3 and pax1 regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis. *Dev Biol* 2001; **236**: 316–329.
- 9 Gordon J, Patel SR, Mishina Y, Manley NR. Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis. *Dev Biol* 2010; **339**: 141–154.
- 10 Depaepe V, Suarez-Gonzalez N, Dufour A, Passante L, Gorski JA, Jones KR *et al*. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 2005; **435**: 1244–1250.
- 11 Furne C, Ricard J, Cabrera JR, Pays L, Bethea JR, Mehlen P *et al*. EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 231–238.
- 12 Pasquale EB. Eph–ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 2008; **133**: 38–52.
- 13 Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M, Chumley MJ *et al*. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 2006; **125**: 1151–1163.
- 14 García-Ceca J, Jimenez E, Alfaro D, Cejalvo T, Muñoz JJ, Zapata A. On the role of Eph signalling in thymus histogenesis; EphB2/B3 and the organizing of the thymic epithelial network. *Int J Dev Biol* 2009; **53**: 971–982.
- 15 Gray DH, Chidgey AP, Boyd RL. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods* 2002; **260**: 15–28.
- 16 Alfaro D, García-Ceca JJ, Cejalvo T, Jimenez E, Jenkinson EJ, Anderson G *et al*. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte–epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 2596–2605.
- 17 Muñoz JJ, Alonso CL, Sacedon R, Crompton T, Vicente A, Jimenez E *et al*. Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. *J Immunol* 2002; **169**: 177–184.
- 18 Alfaro D, Muñoz JJ, García-Ceca J, Cejalvo T, Jimenez E, Zapata A. Alterations in the thymocyte phenotype of EphB-deficient mice largely affect the double negative cell compartment. *Immunology* 2008; **125**: 131–143.
- 19 Muñoz JJ, Cejalvo T, Alonso-Colmenar LM, Alfaro D, García-Ceca J, Zapata A. Eph/Ephrin-mediated interactions in the thymus. *Neuroimmunomodulation* 2011; **18**: 271–280.
- 20 Klug DB, Carter C, Crouch E, Roop D, Conti CJ, Richie ER. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11822–11827.
- 21 Klug DB, Carter C, Gimenez-Conti IB, Richie ER. Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol* 2002; **169**: 2842–2845.
- 22 Foster K, Sheridan J, Veiga-Fernandes H, Roderick K, Pachnis V, Adams R *et al*. Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus. *J Immunol* 2008; **180**: 3183–3189.
- 23 Brelinska R, Kaczmarek E, Ostalska D. Kinetics of thymic stroma development in the foetal period. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 195–196.
- 24 Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJ. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med* 2000; **191**: 1051–1056.
- 25 Osada M, Ito E, Fermin HA, Vazquez-Cintrón E, Venkatesh T, Friedel RH *et al*. The Wnt signaling antagonist Kremen1 is required for development of thymic architecture. *Clin Dev Immunol* 2006; **13**: 299–319.
- 26 Hauri-Hohl MM, Zuklys S, Keller MP, Jeker LT, Barthlott T, Moon AM *et al*. TGF-beta signaling in thymic epithelial cells regulates thymic involution and postirradiation reconstitution. *Blood* 2008; **112**: 626–634.
- 27 Zuklys S, Gill J, Keller MP, Hauri-Hohl M, Zhanybekova S, Balciunaite G *et al*. Stabilized beta-catenin in thymic epithelial cells blocks thymus development and function. *J Immunol* 2009; **182**: 2997–3007.
- 28 Hunziker L, Benitah SA, Braun KM, Jensen K, McNulty K, Butler C *et al*. Rac1 deletion causes thymic atrophy. *PLoS One* 2011; **6**: e19292.
- 29 Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edoff K, Spalding K, Momma S *et al*. Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev* 2005; **19**: 462–471.
- 30 Dohn M, Jiang J, Chen X. Receptor tyrosine kinase EphA2 is regulated by p53-family proteins and induces apoptosis. *Oncogene* 2001; **20**: 6503–6515.
- 31 Foster KE, Gordon J, Cardenas K, Veiga-Fernandes H, Makinen T, Grigorieva E *et al*. EphB–ephrin-B2 interactions are required for thymus migration during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 13414–13419.
- 32 Muñoz JJ, Alfaro D, García-Ceca J, Alonso CL, Jimenez E, Zapata A. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J Immunol* 2006; **177**: 804–813.
- 33 Freywald A, Sharfe N, Miller CD, Rashotte C, Roifman CM. EphA receptors inhibit anti-CD3-induced apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 2006; **176**: 4066–4074.
- 34 Freywald A, Sharfe N, Rashotte C, Grunberger T, Roifman CM. The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses. *J Biol Chem* 2003; **278**: 10150–10156.
- 35 Yu G, Mao J, Wu Y, Luo H, Wu J. Ephrin-B1 is critical in T-cell development. *J Biol Chem* 2006; **281**: 10222–10229.
- 36 Luo H, Wan X, Wu Y, Wu J. Cross-linking of EphB6 resulting in signal transduction and apoptosis in Jurkat cells. *J Immunol* 2001; **167**: 1362–1370.
- 37 Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T *et al*. Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 1996; **86**: 35–46.
- 38 Orioli D, Henkemeyer M, Lemke G, Klein R, T Pawson. Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *EMBO J* 1996; **15**: 6035–6049.
- 39 Jenkinson EJ, Anderson G, Owen JJ. Studies on T cell maturation on defined thymic stromal cell populations *in vitro*. *J Exp Med* 1992; **176**: 845–853.

ICCB 2012

proceedings of the

10th International Congress on Cell Biology

July 25-28, 2012 - Rio de Janeiro (Brazil)

Editors

Hernandes F. Carvalho, Patricia Gama



MEDIMOND

INTERNATIONAL PROCEEDINGS

Eph/ ephrin- mediated interactions govern many aspects of thymus biology

Zapata A.G.¹, Alfaro D.¹, Garcia-Ceca J.¹, Cejalvo T.², Tobajas E.¹, Montero S.¹, Muñoz J.J.²

(1) Department of Cell Biology, Faculty of Biology,

(2) Centre for Cytometry and Fluorescence Microscopy, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

The thymus is a primary lymphoid organ in which a 3D epithelial network supports the functional maturation of lymphoid progenitor cells into T lymphocytes. This complex process is highly dependent on the migration of developing thymocytes to the adequate thymic niches in which thymic epithelial cells (TECs) and thymocytes establish critical interactions. Eph receptors and their ligands, ephrins, partially mediate these interactions and are, therefore, involved in numerous processes occurring in the thymus. In the present article, available information supporting this assumption is reviewed.

Eph is the largest family of tyrosine kinase receptors of animal cells. Their ligands, ephrins, are also extensively represented in numerous cell types. Both Eph and ephrins are divided into two families A and B, based on gene sequence similarities and ligand binding preferences. Although there are some exceptions, some EphA can interact with ephrin B and vice versa, EphA (10 members) bind GPI-anchored ligands, ephrins A (6 members), whereas EphB (6 members) bind transmembrane proteins, ephrins B (3 members). Each Eph kinase can bind with different affinities, several ephrins and vice versa and both receptors and ligands transmit signals, forward and reverse, respectively to the expressing cells. Accordingly, this plastic system allows many different cell interactions that result in a wide spectrum of cellular functions, including cellular attachment/detachment, cell shape and cell migration, cell fate, etc...¹. Both subfamilies of Eph and ephrins are largely expressed in thymus although it is difficult to establish a specific pattern of expression restricted to the two thymic compartments, cortex and medulla. Importantly, both thymocytes and TECs express Eph and ephrins and a same cell can express several Eph and/or ephrins².

Several years ago we determined that the in vitro blockade of Eph/ephrin A interactions partially blocked T-cell differentiation³. In that study, the supply of either soluble EphA-Fc or ephrinA-FC fusion proteins to fetal thymus organ cultures (FTOCs) resulted in a significant reduction of the total yielded cells that affected all the thymic subsets, but largely the DP cell compartment and was accompanied by increased proportions of apoptotic thymocytes. Although these first results suggested certain non-specificity of the Eph/ephrin effects and the possibility that in the absence of one Eph or ephrin any other member of the same family could substitute its lack, further in vivo results demonstrated that **observed effects were specific to the distinct Eph analyzed**. Thus, whereas EphA4-deficient mice showed decreased numbers of thymocytes together with an important blockade of T-cell maturation with decreased proportions of DP cells⁴, EphB2- and/or EphB3-deficient thymuses also showed decreased cell numbers and high proportions of apoptotic thymocytes but few changes in the proportions of T-cell subsets⁵. However, the thymic epithelium showed profound alterations, specific for each mutant type but exhibiting some common features: occurrence of K5⁺K8⁺MTS-10⁺ immature medullary epithelial cells, abundant K5⁺K8⁺MTS-20⁺ cells, K5⁺K8⁺ cells in the cortex and large K5⁺K8⁻ areas devoid of epithelial cell markers⁶. Remarkably, other authors have failed to observed phenotypical changes in the thymus of EphB2- or EphB6-deficient mice^{7,8}.

Because, as mentioned above, both thymocytes and TECs express Eph and ephrins, a second important issue was **to determine which thymic cell type is responsible for the observed phenotypes**. We, therefore, analyzed the thymic phenotype when only thymocytes or TECs were deficient in Eph or ephrins B. These studies demonstrated that **TEC-thymocyte interactions are critical for the Eph/ephrin-mediated effects on thymus**. Whereas EphA4 KO bone marrow (BM) progenitors differentiate normally in SCID thymuses with a normal Eph/ephrin expression, WT progenitors fail to differentiate in EphA4 KO fetal thymus lobes grafted under the kidney capsule of WT mice, showing decreased proportions of DP thymocytes⁴. In correlation with these results, an immunohistochemical study demonstrated the collapse undergone by the EphA4-deficient cortical epithelium where DP cells mature. In similar experiments, SCID mice that received BM progenitors deficient in different Eph B showed blockade of T-cell differentiation at distinct stages of maturation confirming the specificity of these molecules. Chimaeras established with EphB2^{-/-} or EphB2/B3^{-/-} progenitor cells show blockade of thymocyte development at DN stage. SCID mice receiving precursor cells that express a truncated EphB2

molecule, EphB2^{LacZ}, that can transmit reverse signals to ephrinB-expressing neighboring cells, but not forward signals, reach the DP stage but do not generate SP thymocytes. Finally, EphB3^{-/-} precursor cells injected in SCID mice show a partial blockade of T-cell development at DN stage resulting in decreased proportions of DP thymocytes. Together these results indicate that **both EphB2 and EphB3 exert an autonomous control on thymocyte development but the lack of EphB2 results in a more severe phenotype**. In addition, the epithelial phenotype of these chimaeric thymuses was similar to that observed in the EphB KO mice demonstrating that **the thymic epithelial organization requires a non-autonomous EphB-dependent induction by developing thymocytes**⁹. Thymuses whose epithelium was deficient in ephrinB1 and/or B2 showed a smaller size than WT counterparts and profound alterations in the thymic epithelial network but few changes in the thymocyte subsets¹⁰. These changes were restricted to the double mutants in which a relationship could be established between altered T-cell development and severity of epithelial changes. **The expression of ephrinB1 and ephrinB2 in TECs is necessary for a correct epithelial organization and T-cell maturation**. In the thymuses in which ephrins B were selectively deleted in thymocytes, there was a partial blockade of T-cell maturation with increased proportions of DN3 cells¹⁰. Nevertheless, the phenotype severity was highly dependent on the mouse strain, being more evident in those of mixed background, a phenomenon described for other Ephs and ephrins. The thymic epithelial component also showed thymic medulla fragmentation and numerous, big epithelial cysts. Taken together these results support that: **Eph and ephrins affect thymus phenotype through the modulation of thymocyte-TEC interactions; EphB2 and EphB3 and their ligands ephrinB1 and ephrinB2 play autonomous and non-autonomous roles in T-cell differentiation and thymic epithelial network organization, and the different reported thymic phenotypes are the result of the balance of combined Eph/ephrin transmitted signals**.

The relevance of Eph/ephrin-mediated thymocyte-TEC interactions for thymus functioning was confirmed in *in vitro* experiments. EphrinB1-Fc fusion protein supplied to reaggregate thymus organ cultures formed by fetal TECs and DP thymocytes disorganized the three-dimensional epithelial network of thymus. Furthermore, ephrinB1-Fc proteins prevented thymocyte-TEC associations and altered TcR signaling¹¹. More recently, we demonstrated that the numbers of thymocyte-TEC conjugates formed decreased when using EphB2- or ephrinB-deficient DP thymocytes, but increased when thymocytes expressed a truncated EphB2 molecule, the unique SCID chimaeras that, as described above, exhibited normal proportions of DP thymocytes⁹. Analysis of thymus development in several Eph/ephrinB-deficient mice has confirmed that the effects of Eph/ephrinB are not restricted to adult thymus. The thymic primordium is a pharyngeal endoderm derivative which progresses as an outgrowth with a central lumen. As early as E11.5 this outgrowth is formed by polarized pseudo- or bi-stratified epithelium that immediately folds in a branching morphogenesis pattern. When this early branching process is examined in EphB2-deficient mice, the lack of EphB2 does not affect its general pattern but alters the development of epithelial branches that appear collapsed.

The arrival of lymphoid progenitors to E12 thymic primordium determines changes in the TEC shape and the 3D-organization of thymic epithelium. Studies performed on *in vitro* colonization of FTOCs have demonstrated that EphB2 also plays a role in this process¹². We found decreased immigration into the mutant thymus of all BM progenitors studied, including the WT ones. EphB2^{-/-}, but not EphB2^{LacZ}, progenitors had reduced capacity to colonize WT FTOCs in comparison with WT progenitors. On the other hand, FTOCs from EphB2^{-/-} or EphB2^{LacZ} mice, which received EphB2^{-/-} BM progenitors showed significantly lower capacities for homing than those receiving EphB2^{LacZ} or WT precursors. When WT and mutant progenitors competed to colonize FTOCs, EphB2^{-/-} cells showed reduced capacities. Furthermore, mutant progenitors had a lower capacity to reach the centre of lobes, remaining on the periphery, than WT ones, particularly when lobes were derived from mutant mice¹².

On the other hand, very early EphB-deficient thymuses (E12.5-13.5) exhibit small size, delayed maturation of TEC progenitors, loose cortical epithelium and changes in the phenotype of medullary areas. These early changes result in a reduced cortical epithelial network and alter position and size of medullary areas (E15.5) to finally induce (E17.5, 2PN) a more severe phenotype in later stages⁶.

Recently, we also analyzed the role of ephrinB1 and ephrinB2 in cortical and medullary epithelium development¹⁰. In the adult thymic cortex, two Ly51^{hi} and Ly51^{lo} cell subsets, can be identified. Ly51^{hi} TECs appeared in the subcapsular cortex and also formed a discontinuous layer in the cortico-medullary border. In these two areas some Ly51^{hi} cells are arranged longitudinally and radially to the medulla whereas Ly51^{lo} cells appeared between them. In thymuses with ephrinB1-deficient TECs, the occurrence of two Ly51 subsets is difficult to evidence: cTECs are retracted and form a homogeneous and dense thymic cortex. On the contrary, in thymuses in which TECs do not express ephrinB2 there is a clearly defined Ly51^{lo} outer cortex and a Ly51^{hi} region in the inner cortex. In thymuses with double ephrinB-deficient TECs, the thymic cortex shows homogeneous Ly51 expression although it is possible to identify some Ly51^{hi} cells in the inner cortex and Ly51^{lo} in the outer area. In these double mutants, flow cytometry analysis demonstrated that the **lack of both ephrins results in a delayed appearance of Ly51^{hi} cells during thymus ontogeny with accumulation of Ly51^{lo} cells at E14.5 and decreased numbers of Ly51^{med} and Ly51^{hi} cells in the later developmental stages**. On the other

hand, **ephrinB1 expression on TECs was necessary for the stratification and differentiation of thymic medullary epithelium, ephrinB2 for the longitudinal growth of epithelial branches and both ephrins are involved in the expansion and 3D-organization of the thymic epithelial network¹⁰.**

Acknowledgements: This work was supported by grants BFU 2010-18250 from the Spanish Ministry of Education and Science and RD06/0010/0003 from the Spanish Ministry of Health and Consumption

References

1. PASQUALE EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133, 38-52, 2008
2. MENDES-DA-CRUZ DA, STIMAMIGLIO MA, MUÑOZ JJ, ALFARO D, TERRA-GRANADO E, GARCIA-CECA J, ALONSO-COLMENAR LM, SAVINO W, ZAPATA A. Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. *FASEB J* July 19, Epub ahead, 2012
3. MUÑOZ JJ, ALONSO CL, SACEDON R, CROMPTON T, VICENTE A, JIMENEZ E, VARAS A, ZAPATA A. Expression and function of the EphA receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. *J Immunol* 169, 177- 184, 2002
4. MUÑOZ JJ, ALFARO D, GARCIA-CECA J, ALONSO LM, JIMÉNEZ E, ZAPATA A. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J Immunol* 177, 804-813, 2006
5. ALFARO D, MUÑOZ JJ, GARCIA-CECA J, CEJALVO T, JIMÉNEZ E, ZAPATA A. Alterations in the thymocyte phenotype of EphB-deficient mice largely affect the double negative cell compartment. *Immunology* 125, 131-143, 2008
6. GARCIA-CECA J, JIMÉNEZ E, ALFARO D, CEJALVO T, MUÑOZ JJ, ZAPATA A. On the role of Eph signalling in thymus histogenesis. *Int J Dev Biol* 53, 971-982, 2009
7. SHIMOYAMA M, MATSUOKA H, NAGATA A, IWATA N, TAMEKANE A, OKAMURA A, GOMYO H, ITO M, JISHAGE K, KAMADA N, SIZUKI H, TETSUO NODA T, MATSUI T. Developmental expression of EphB6 in the thymus: lessons from EphB6 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 87-94, 2002
8. COLES MC, ADAMS R, ADAMS S, RODERICK K, NORTON T, WILKINSON D, KIOUSSIS D. The role of Eph receptors and ephrin ligands in T cell development in the thymus. *Clin Invest Med* 56D, 2004
9. ALFARO D, MUNOZ JJ, GARCIA-CECA J, CEJALVO T, JIMÉNEZ E, ZAPATA A. The Eph/ephrin B signal balance determines the pattern of T-cell maturation in the thymus. *Immunol Cell Biol* 89, 844-852, 2011
10. CEJALVO T. Role of ephrinB1 and ephrinB2 in the development and function of thymus (in Spanish). PhD thesis, Complutense University, Madrid, 2011
11. ALFARO D, GARCIA-CECA J, CEJALVO T, JIMÉNEZ E, JENKINSON EJ, ANDERSON G, MUÑOZ JJ, ZAPATA A. EphrinB1-EphB signalling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur J Immunol* 37, 2596-2605, 2007
12. STIMAMIGLIO MA, JIMÉNEZ E, SILVA-BARBOSA SD, ALFARO D, GARCIA-CECA J, MUÑOZ JJ, CEJALVO T, SAVINO W, ZAPATA A. EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. *J Leuk Biol* 88, 483-494, 2010

